

Исследование суперметаллизированных комплексов биомолекул с использованием H/D обмена в электроспрее и масс-спектрометрии высокого разрешения.

П.В. Яковлев^{1,3}, Ю.И. Костюкевич^{1,2,3}, А.С. Кононихин^{1,2}, И.А. Попов^{1,2} и Е.Н. Николаев^{1,2,3}

¹ *Московский Физико – Технический Институт (государственный университет)*

² *Институт энергетических проблем химической физики РАН*

³ *Сколковский институт науки и технологий*

Известна важная роль комплексов молекул с ионами металлов. В биологических процессах ионы металлов принимают участие в: координировании вторичной структуры макромолекул, переносе заряда, формировании комплексов, каталитических процессах. В настоящее время известно, что ионы переходных металлов участвуют в нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона (БП) и прионные заболевания.

В первом исследовании изучались комплексы убиквитина с атомами церия (III). Был получен спектр чистого убиквитина, продемонстрирован эффект суперметаллизации убиквитина атомами церия, проведена реакция дейтеро/водородного обмена для комплексов.

Чистый убиквитин ионизируется, присоединяя протоны, образуя ионы с различным зарядом. При добавлении в раствор ионов металла (получаемых при растворении ацетата металла в воде) белок может ионизироваться, как присоединяя протон, так и присоединяя катион металла. Из рис 1а видно, что добавление ионов металла в раствор значительно изменило вид масс - спектра. Для всех зарядовых состояний наблюдается образование комплексов с различным количеством присоединенных атомов церия. Особо следует отметить тот факт, что присоединение каждого атома церия сопровождается отрывом трех атомов водорода, что было подтверждено точным измерением масс ионов с помощью масс – спектрометрии ИЦР с преобразованием Фурье.

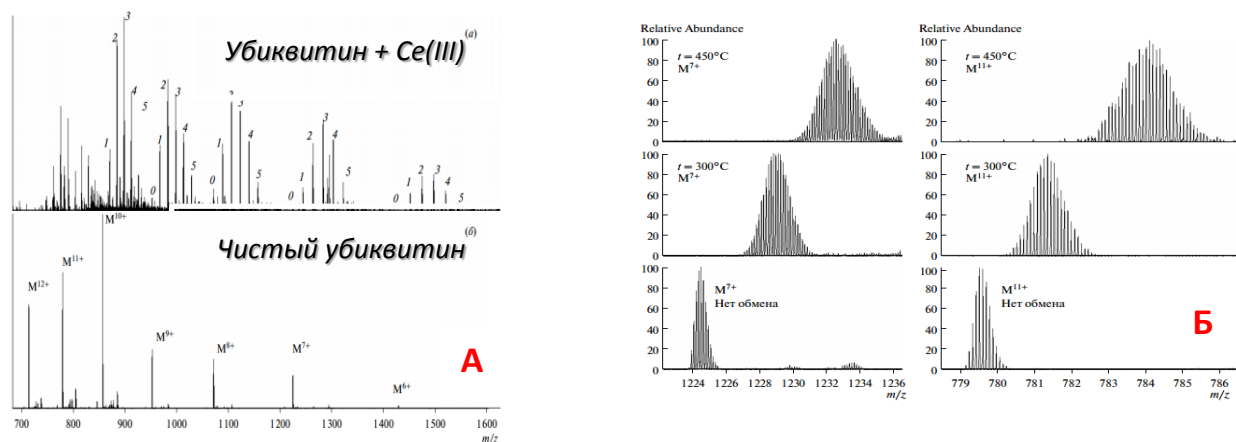


Рисунок 1. а) Масс спектр убиквитина. б) Масс – спектр комплекса убиквитина с Ce после проведения реакции дейтеро/водородного обмена

Важно отметить, что присоединение 5 атомов церия на 6-зарядный ион белка не может объясняться простой катионизацией, поскольку сопровождается отрывом 15 атомов водорода.

Тот факт, что присоединение каждого атома церия сопровождается отрывом трех атомов водорода, наводит на мысль, что атом церия образует три ковалентные связи с белком при присоединении. Была выдвинута гипотеза, что образование трех ковалентных связей около центра может значительно изменить конформацию белка. Для более подробного изучения этой проблемы была проведена реакция дейтеро/водородного обмена.

Из рисунка 1б видно, что глубина обмена зависит от температуры десольватирующего капилляра.

На рисунке 2а представлена зависимость числа обменов от температуры десольватирующего капилляра для различных зарядовых состояний при разном числе присоединенных атомов церия. Для подробного изучения зависимости глубины H/D обмена результаты также были представлены в другом виде. Можно заметить, что для любого зарядового состояния глубина обмена практически не зависит от числа присоединенных атомов церия.

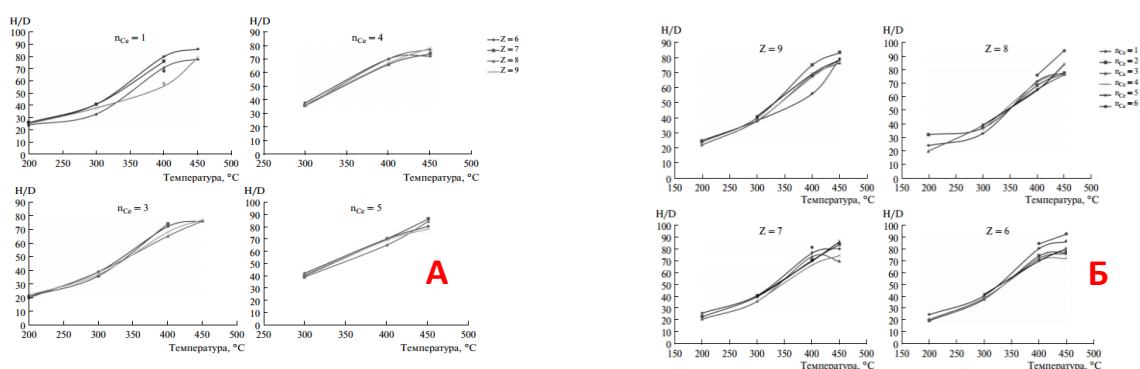


Рисунок 2 а) Зависимость H/D обмена от температуры десольватирующего капилляра для различных зарядовых состояний при разном числе присоединенных атомов церия. б) Зависимость H/D обмена от температуры десольватирующего капилляра для зарядовых состояний (z) 6,7,8,9 при различном числе присоединенных атомов церия.

Из полученных результатов, можно сделать вывод, что присоединение атома церия практически не влияет на глубину H/D обмена. Молекула, присоединившая 5 атомов, обменивает практически то же количество атомов водорода, что и присоединившая всего один атом церия. Всего молекула убиквитина содержит 144 подвижных атома водорода, из них 72 на основной цепи и 72 на боковых остатках аминокислот. Также, молекула убиквитина в чистой воде находится в свернутой конформации, но при соотношении вода/метанол 80/20 начинает переходить в развернутую конформацию. Также известно, что только ~60 % подвижных атомов водорода доступно для обмена.

В этом эксперименте вода/ метанол были взяты в соотношении 1/1. Поэтому, молекулы убиквитина находились в развернутой конформации. Отсутствие явной зависимости количества H/D обмена от числа присоединенных атомов церия позволяет сделать вывод о том, что конформация суперметаллизированных комплексов убиквитина существенно не изменяется.

В следующем исследовании изучается зависимость образования в результате ESI ионизации комплексов бета – циклодекстрина с белками и металлами в газовой фазе. Демонстрируются ион/молекулярные комплексы циклодекстрина с металлами в высоких степенях окисления, а именно комплексы с Ce(III) и Th(IV).

На рисунке 3 показаны масс – спектры, отражающие образование комплексов бета – циклодекстрина с убиквитином при различных температурах капилляра. При низких температурах преобладает ион $[CD+H_2O]^+$. CD означает бета – циклодекстрин. При увеличении температуры наблюдаются пики, отвечающие молекулярным ионам комплекса убиквитина с бета – циклодекстрином, причем такие ионы наблюдаются для разных зарядовых состояний $[M+CD+7H]^{7+}$, $[M+CD+6H]^{6+}$. При дальнейшем повышении температуры, интенсивность комплексов уменьшается и для температуры $400^\circ C$ преобладают пики, соответствующие убиквитину. Разрушение комплекса белка с бета – циклодекстрином согласуется с предположением о том, что комплекс представляет собой слабосвязанный нековалентный комплекс. Важно отметить, что столкновительная фрагментация не позволяет локализовать область присоединения сахара, поскольку единственный путь фрагментации – отщепление молекулы бета – циклодекстрина.

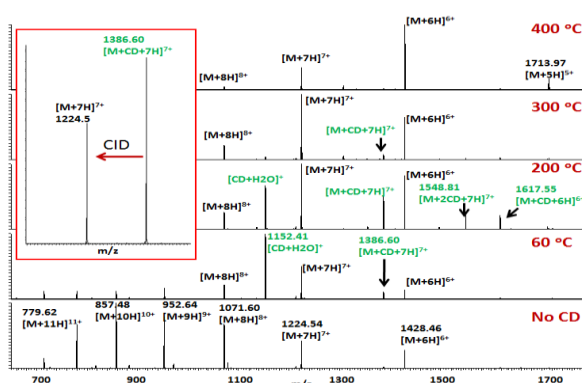


Рисунок 3. Масс – спектр убиквитина при различной температуре капилляра, при добавлении бета – циклодекстрина. Выделено в рамке – единственный путь фрагментации в комплексе при столкновительной диссоциации.

На рисунке 4 представлены комплексы бета – циклодекстрина с торием. представлено первое, насколько известно, наблюдение комплекса олигосахарида с четырехвалентным металлом Th. Для введения ионов Th^{4+} в раствор использовался $Th(NO_3)_4$. Отметим, что при низких температурах в спектре доминируют ионы $[CD+H]^+$ и $[CD+H_2O]^+$. При увеличении температуры бета-циклодекстрину становится более выгодно ионизироваться, присоединяя не протон, а катион Th^{4+} , но важно, что присоединение тория сопровождается потерей 4-х атомов водорода, что свидетельствует о ковалентном, а не о координационном взаимодействии металла и сахара. Заметим, что при повышенных температурах удастся наблюдать образование таких сложных ионов, как $[2CD+Th-2H]^{2+}$, $[3CD+2Th-5H]^{3+}$, $[4CD+2Th-5H]^{3+}$, $[6CD+3Th-8H]^{4+}$. Точное установление элементного состава возможно благодаря использованию масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса сверхвысокого разрешения. В экспериментах достигалась разрешающая способность порядка 400 000. Также обратим внимание на образование комплекса, когда у атома Th сохраняется одна нитрогруппа: $[CD+Th+NO_3-2H]^+$.

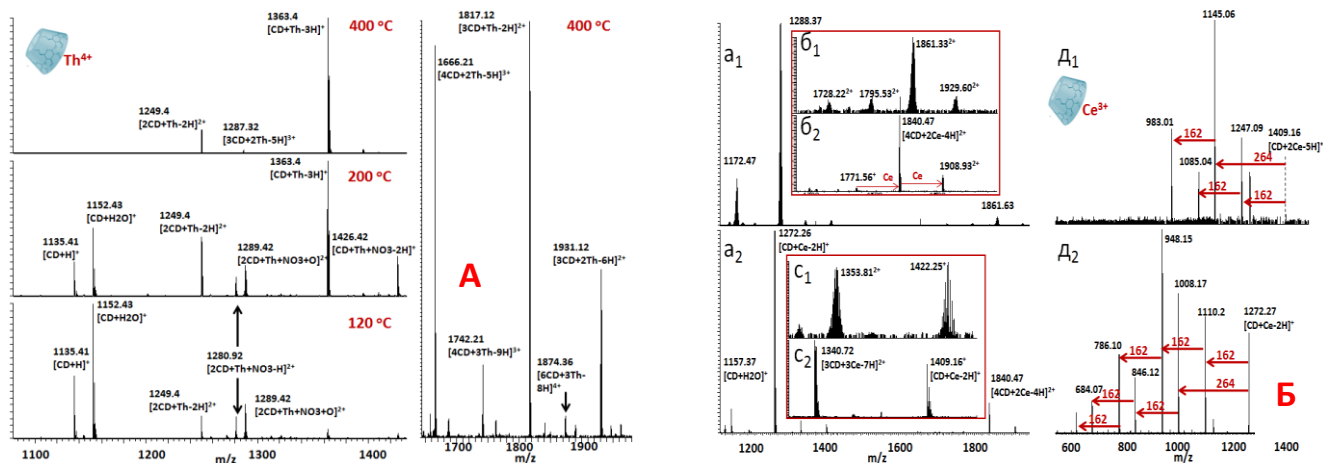


Рисунок 4 а) Масс – спектр комплексов бета – циклодекстрина с торием. б) Масс – спектр комплексов бета – циклодекстрина с церием. Приведены участки масс-спектра различного массового диапазона; а1, б1, с1 – после реакции дейтеро/водородного обмена в источнике ионизации; а2, б2, с2 – без проведения реакции дейтеро/водородного обмена; д1 – столкновительная фрагментация комплекса $[CD+2Ce-5H]^+$, д2 – столкновительная фрагментация комплекса $[CD+Ce-2H]^+$.

Состав комплексных ионов оказался более бедным, чем при образовании комплексов с Th, удалось наблюдать ионы $[CD+Ce-2H]^+$, $[3CD+3Ce-7H]^{2+}$, $[CD+Ce-2H]^+$, $[4CD+2Ce-4H]^{2+}$. Как и для случая с Th присоединение Ce сопровождается потерей 3-х атомов водорода. Также представлены спектры столкновительной фрагментации для ионов $[CD+Ce-2H]^+$ и $[CD+2Ce-5H]^+$. Известно, что для циклических олигосахаридов преобладают два канала фрагментации: отщепление фрагмента с массой 162 и отщепление фрагмента с массой 264. Как видно, при фрагментации комплекса бета-циклодекстрина с различным количеством атомов церия наблюдается отщепление таких же фрагментов. Ион металла в результате фрагментации не теряется.

Для дополнительного исследования комплексов бета-циклодекстрина с Ce была проведена реакция дейтеро/водородного обмена в источнике ионизации.

Результаты анализа реакции дейтеро/водородного обмена для комплексов бета-циклодекстрина с Ce приведены в Табл.1. Можно видеть, что при увеличении размера комплекса количество обменов водорода на дейтерий уменьшается, что может свидетельствовать о том, что атомы водорода в области присоединения молекул бета-циклодекстрина друг к другу оказываются более трудно доступными.

Были также исследованы комплексы белка одновременно с металлом и бета – циклодекстрином. Наблюдение такого комплекса представлено на рисунке 5. Для различных зарядовых состояний обнаружены комплексы, образующиеся в результате присоединения нескольких Ce, а также комплексы, образующиеся в результате присоединения нескольких атомов Ce и молекулы бета-циклодекстрина. Как и раньше, при увеличении температуры металл предпочитает связываться с бета – циклодекстрином, а не с убиквитином.

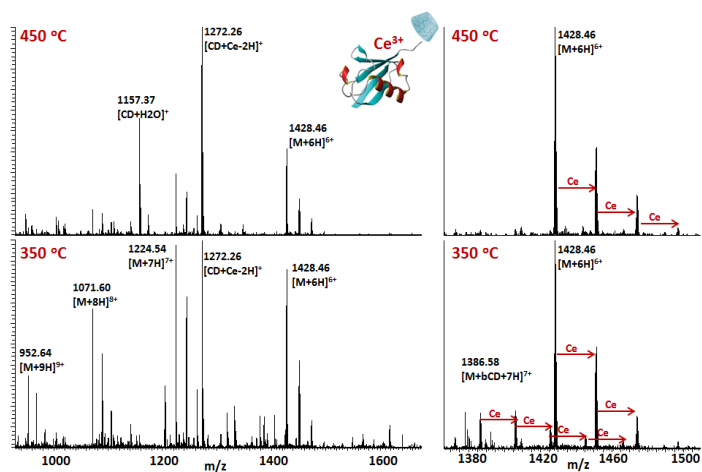


Рисунок 5 Образование комплексов убиквитина одновременно с Ce и с бета-циклодекстрином для различных температур десольватирующего капилляра. Здесь M – убиквитин.

Ион	m/z	m/z (H/D)	% H/D
$[\text{CD}+\text{H}_2\text{O}]^+$	1157.37	1172.47	69%
$[3\text{CD}+3\text{Ce}-7\text{H}]^{2+}$	1340.72	1353.81	47%
$[\text{CD}+\text{Ce}-2\text{H}]^+$	1409.16	1422.25	69%
$[4\text{CD}+\text{Ce}-1\text{H}]^{2+}$	1771.56	1795.53	58%
$[4\text{CD}+2\text{Ce}-4\text{H}]^{2+}$	1840.47	1861.33	52%
$[4\text{CD}+3\text{Ce}-7\text{H}]^{2+}$	1908.93	1929.60	54%

Таблица 1 Количество замен атомов водорода на дейтерий при проведении реакции дейтеро/водородного обмена в источнике ионизации