

На правах рукописи

УДК 543.51

КОНОНИХИН АЛЕКСЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

**Исследование состава и структуры реальных биологических объектов  
при помощи масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса с  
преобразованием Фурье.**

01.04.17 – химическая физика, в том числе физика горения и взрыва

автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва, 2007г.

Работа выполнена в Институте энергетических проблем химической физики  
Российской академии наук

Научный руководитель:	Доктор физико-математических наук, профессор Николаев Евгений Николаевич
Официальные оппоненты:	Доктор физико-математических наук, профессор, Барашев Петр Петрович  Доктор физико-математических наук, Морозов Игорь Иллиодорович

Ведущая организация:  
Московский физико-технический институт (Государственный университет)

Защита состоится «14» ноября 2007г. в 14 час. 00 мин. на заседании  
диссертационного совета Д 002.112.01 при Институте энергетических проблем  
химической физики Российской академии наук по адресу: 119334, г. Москва,  
Ленинский проспект, д. 38, корп.2, ИНЭП ХФ РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической  
физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук.

Автореферат разослан «13» октября 2007г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета

Кандидат химических наук



М.И. Николаева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

### **Введение. Актуальность проблемы.**

При помощи современных методик, основанных на масс-спектрометрическом анализе, можно исследовать биологические объекты самого разного происхождения и сложности. Это стало возможным благодаря открытию новых методов ионизации вещества, метода электроспрей и метода лазерной десорбции/ионизации из матрицы (МАЛДИ), которые позволили переводить в газовую фазу и одновременно ионизировать большие биологические молекулы, такие как пептиды, белки и полинуклеотиды.

Масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (ИЦР ПФ) обладает рядом преимуществ по сравнению с другими методами масс-спектрометрии. Главными достоинствами данной методики являются: сверхвысокая разрешающая способность и рекордная точность измерения масс. На базе современного масс-спектрометра ИЦР ПФ можно реализовывать методики для однозначной идентификации элементного состава как индивидуальных биомолекул, так и их смесей.

В настоящее время полностью расшифрованы геномы различных организмов, в том числе и человека. Относительно небольшим набором генов кодируется большое количество разных белков. В связи с исследованиями многообразия белков содержащихся в различных биологических объектах возникла новая фундаментальная концепция, названная «протеом» (ПРОТЕиновое дополнение к генОМу). Создана новая дисциплина - протеомика, которая призвана дополнить и аннотировать геномные исследования. Современная масс-спектрометрия ИЦР ПФ занимает передовые позиции в решении основной задачи протеомики - идентификация белков и пост-трансляционных модификаций в них.

Масс-спектрометр ИЦР ПФ обладает ограниченным динамическим диапазоном, в то же время, протеомы различных организмов содержат большой диапазон относительных концентраций белков. Необходимо использовать масс-

спектрометрии ИЦР ПФ в комбинации с существующими аналитическими методами разделения (жидкостная хроматография, электрофорез).

В данной работе автор разрабатывал и оптимизировал методы использующих масс-спектрометрию ИЦР ПФ для исследования элементного и протеомного состава таких объектов как: (1) моча человека, (2) конденсаты выдыхаемого человеком воздуха (КВВ), (3) гумусовые кислоты. Так же в работе были разработаны и использованы новые подходы для обработки и интерпретации полученных данных.

**Цели и задачи:** (1) исследовать механизмы получения многозарядных ионов и разработать способ, позволяющий увеличить выход многозарядных ионов в методе МАЛДИ; (2) исследовать возможности различных методов фрагментации для идентификации биомакромолекул; (3) исследовать зависимость достоверности идентификации биомакромолекул от точности измерения масс и разрешения; (4) разработать хромато-масс-спектрометрические методики для анализа протеомного состава мочи и КВВ человека; (5) разработать и внедрить метод точной массово-временной метки для анализа протеома мочи; (6) разработать подход идентификации белков с учетом произвольных пост-трансляционных модификаций в них и использовать данный подход при исследовании протеома мочи человека; (7) создать новую базу данных, состоящую из точных массово-временных меток, для быстрого поиска и идентификации белков содержащихся в моче человека; (8) разработать методику на основе масс-спектрометрии ИЦР для исследования элементного состава гумусовых кислот.

#### **Научная новизна работы.**

1. Впервые предложен способ увеличения выхода многозарядных ионов биомакромолекул в методе МАЛДИ.

2. Впервые исследован протеомный состав конденсата выдыхаемого человеком воздуха, при помощи разработанной хромато-масс-спектрометрической методики.

3. Впервые разработан подход для протеомного анализа мочи человека, который позволяет осуществлять поиск и идентификацию пост-трансляционных модификаций, в том числе заранее неизвестных, в идентифицированных белках.

4. Впервые реализована новая процедура для поиска и идентификации белков, содержащихся в моче человека, использующая подход точных массово-временных меток.

5. Впервые создана новая база данных точных массово-временных меток протеома мочи человека.

6. Впервые предложен новый метод для определения элементного состава гумусовых кислот, основанный на точном измерении масс, при помощи масс-спектрометрии ИЦР ПФ, и статистической обработки данных.

#### **Практическая значимость работы.**

Предложенный способ получения многозарядных ионов в методе МАЛДИ позволит более эффективно использовать данный метод для масс-спектрометрии ИЦР ПФ.

Разработанные хромато-масс-спектрометрические подходы для анализа биологических жидкостей человека могут быть в дальнейшем использованы для диагностики различных отклонений в организме человека, вызванных, в том числе, заболеваниями.

Новая база данных точных массово-временных меток может использоваться для высокопроизводительного анализа протеома мочи человека.

Новый подход для анализа гумусовых кислот может использоваться для элементного и сравнительного анализа сложных смесей, различного БиоГео происхождения.

Методики, развитые для анализа конденсатов выдыхаемого человеком воздуха, в дальнейшем могут быть использованы для создания новых методов диагностики состояния легких.

**Личный вклад автора.** Материал, представленный в диссертации, получен при непосредственном участии автора как в постановке задачи, так и при

проведении исследований, выполнении экспериментов. Обработка и анализ ИЦР масс-спектров гумусовых кислот проводился автором совместно с Э.В. Куненковым (Химический факультет МГУ). База данных точных массово-временных меток создавалась автором совместно с Д.М. Автономовым (ИНЭП ХФ РАН) и И.А. Агроном (ГУ НИИ БМХ РАМН). Подход по поиску и идентификации пост-трансляционных модификаций был разработан автором совместно с Д.М. Автономовым (ИНЭП ХФ РАН). Пробы мочи были приготовлены С.А. Мошковсим (ГУ НИИ БМХ РАМН). Пробы конденсатов выдыхаемого воздуха были приготовлены В.С. Куровой (ИБХФ РАН). Диссертационная работа выполнена в Институте энергетических проблем химической физики Российской академии наук, в лаборатории ионной и молекулярной физики, часть работ одновременно выполнялась автором в Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук в период с 2004 по 2007 год.

**Апробация работы.** Результаты работы докладывались и обсуждались на следующих Российских и международных конференциях: 1-й Международный симпозиум по масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения для анализа на молекулярном уровне сложных (БиоГео) систем, 6-7 Ноября, Германия, 2006; Конференция по программе фундаментальных исследований РАН «Фундаментальные науки- медицине», Москва, 2006 г.; Третья международная конференция-школа «Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии», Звенигород, Россия, 16-21 Апреля, 2007; 55-я конференция Американского масс-спектрометрического общества, Индианаполис, США, 2007; 8-я Европейская конференция по ИЦР масс-спектрометрии и Российско-Немецкий семинар, 27 Август - 1Сентябрь, Москва, Россия, 2007; Третий съезд ВМСО, 2-ая Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы», 3-7 сентября 2007 г., Москва.

**Публикации.** Основное содержание диссертации опубликовано в работах, список которых приводится в конце автореферата. Работы, результаты

которых изложены в диссертации выполнены при поддержке РФФИ, INTAS, CRDF, в рамках программ Президиума РАН, ОХНМ РАН.

**Структура и объем диссертации.** Работа изложена на 105 страницах, содержит 30 рисунков и 4 таблицы. Диссертация состоит из четырех глав, заключения и списка цитируемой литературы.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Первая глава является литературным обзором, в котором дается краткое описание объектов, исследуемых в работе (гумусовые кислоты, моча и конденсаты выдыхаемого человеком воздуха), обсуждаются трудности и ограничения традиционных методов исследования данных объектов, обсуждаются возможности и преимущества применения масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (ИЦР ПФ) для исследования данных объектов, в комбинации с различными методами фрагментации и ионизации биомакромолекул, с высокоэффективной жидкостной хроматографией и новыми методами обработки масс-спектров ИЦР.

Точная и однозначная идентификация, как индивидуальных биомакромолекул, так и их смесей напрямую связана с точностью измерения масс и разрешающей способностью масс-спектрометра ИЦР ПФ, поэтому основное внимание в обзоре уделено исследованию данных характеристик.

### Точность измерения масс и разрешение в масс-спектрометрии ИЦР ПФ.

Измеряемой величиной в масс-спектрометрии ИЦР ПФ является частота, по значению которой можно рассчитать массу молекулярного иона используя общепринятое калибровочное выражение:

$$\frac{m}{z} = \frac{A}{\nu_+} + \frac{B}{\nu_+^2},$$

(1)

где  $m$  и  $z$  – масса и заряд молекулярного иона соответственно,  $\nu_+$  - измеряемая частота. Коэффициенты  $A$  и  $B$  являются постоянными величинами и рассчитываются при калибровке масс-спектрометра по двум или более известным массам. Выражение (1) получается в приближении одного иона и не учитывает влияние объемного заряда и кулон-кулоновского взаимодействия между ионами. На практике для более точных измерений лучше использовать внутреннюю калибровку масс-спектрометра, когда в образце содержатся одновременно исследуемое вещество и калибрانت, поскольку, ионы калибранта

вместе с ионами исследуемого вещества, подвержены одинаковым эффектам. Можно, также проводить точные измерения с использованием внешней калибровки, запуская калибрانت отдельно от исследуемого вещества, если для каждого измерения в ИЦР ячейку захватывается примерно одинаковое число ионов.

Разрешающей способностью в масс-спектрометрии принято называть отношение значения  $m/z$  пика к его полуширине  $\Delta m_{50\%}$  (ширине на середине высоты):

$$R = \frac{m}{\Delta m_{50\%}},$$

(2) В случае масс-спектрометра ИЦР ПФ данное выражение можно переписать следующим образом:

$$R = \frac{m}{\Delta m_{50\%}} = -\frac{\omega}{\Delta \omega_{50\%}} = -\frac{zq_0 B_0}{m \Delta \omega_{50\%}}, \text{ (в СИ)}$$

(3)

где  $B_0$  – величина магнитного поля в ИЦР ячейке,  $q_0$  – элементарный заряд.

Либо в приближении низкого давления в ИЦР ячейке:

$$R = \frac{M}{\Delta M} = \frac{0.132qB_0 T}{m}, \text{ (в СИ)}$$

(4)

где  $T$  – время детектирования частотного сигнала, наводимого ионом на детектирующие пластины ячейки ИЦР.

Из выражения (4) следует, при постоянном значении магнитного поля и значения  $m/z$ , разрешение пика растет с увеличением времени детектирования сигнала. Во время хромато-масс-спектрометрического анализа смеси биологического происхождения, время детектирования сигнала в ячейке ИЦР ограничено из-за необходимости быстрого последовательного измерения масс нескольких молекулярных ионов, которые поступают фракциями из хроматографа в источник электроспрея.

В данной работе все измерения производились на гибридном масс-спектрометре Finnigan LTQ FT (Thermo Electron, Бремен, Германия), который

состоит из масс-спектрометра ИЦР ПФ, со сверхпроводящим соленоидом 7 Тесла, и высокочувствительной линейной квадрупольной ионной ловушки.

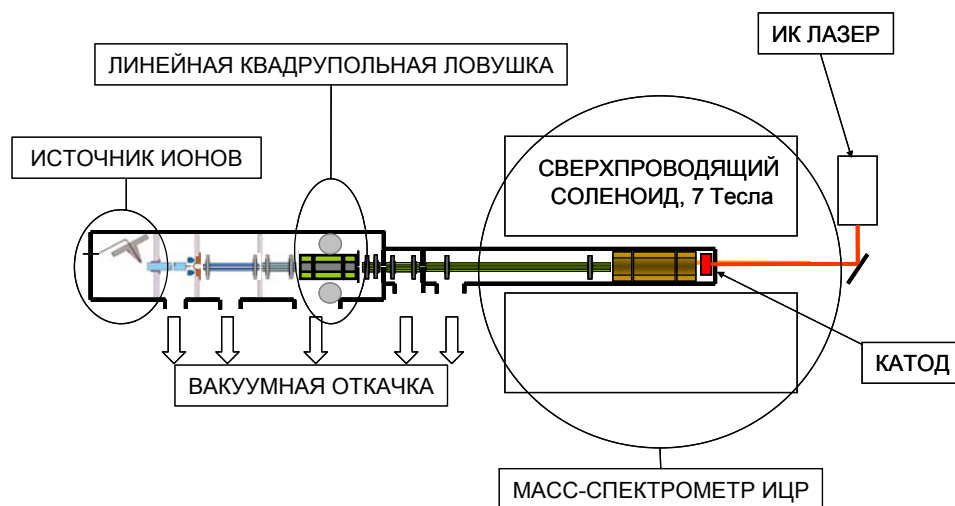


Рис. 1. Схема гибридного масс-спектрометра Finnigan LTQ FT.

Данный гибридный масс-спектрометр является самым современным прибором в своем классе и позволяет проводить измерения в режиме ИЦР ПФ с максимальным разрешением  $R=500000$  для  $m/z$  400 и точностью измерения масс  $2\text{ppm}$ , при использовании внешней калибровки. Главными достоинствами прибора являются автоматический контроль числа ионов в масс-анализаторе и возможность использовать современные методы ионизации (электроспрей, атмосферный МАЛДИ) и фрагментации биомолекул. В линейной квадрупольной ионной ловушке реализована столкновительно индуцированная фрагментация (CID), в ячейке ИЦР - инфракрасная мультифотонная диссоциация (IRMPD) и диссоциация, происходящая при захвате медленных электронов (ECD).

Масс-спектрометр Finnigan LTQ FT является удобной платформой для разработки и использования новых хромато-масс-спектрометрических методик.

**Во второй главе** предлагается способ для увеличения выхода многозарядных ионов в методе МАЛДИ.

Для метода МАЛДИ характерно образование преимущественно однозарядных ионов – это приводит к простоте понимания полученных масс-

спектров. Выход многозарядных ионов мог бы значительно расширить возможности метода МАЛДИ при исследовании биополимеров и их нековалентно связанных комплексов. Для увеличения выхода многозарядных ионов в методе МАЛДИ был разработан специальный способ приготовления образца, который заключается в электро-напылении образца на различные по кристаллической структуре слои МАЛДИ матрицы. Была разработана и собрана специальная установка для электро-напыления образца, показанная на рисунке 2.

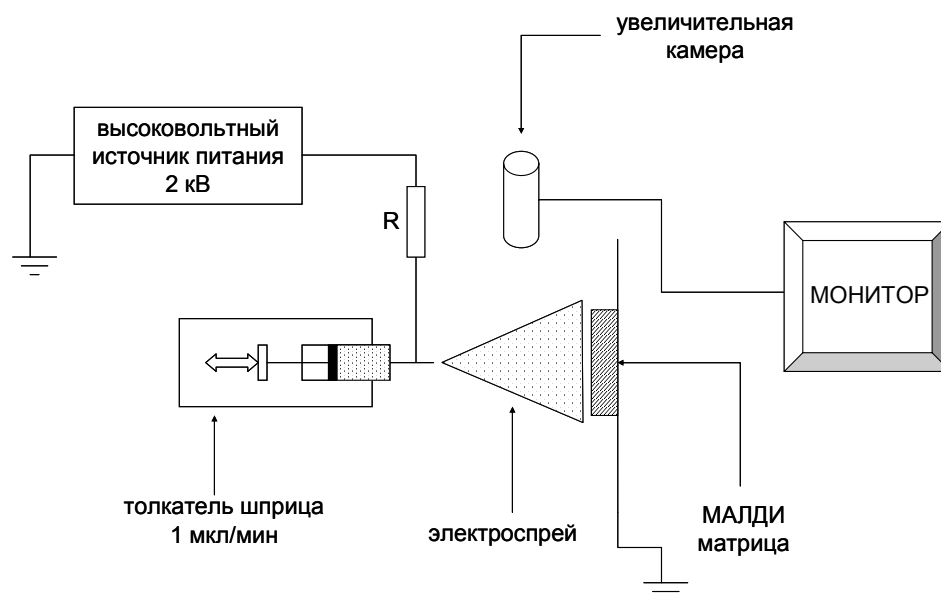


Рис. 2. Схема установки для электро-напыления образца на слой МАЛДИ матрицы.

При приготовлении слоя матрицы водно-ацетонитрильный раствор с концентрацией матрицы 5-15г/л наносился на металлическую подложку (зона нанесения ~5мм) и быстро высушивался в вакуумной камере. Структура и однородность слоя матрицы анализировались при помощи оптического микроскопа. Все масс-спектры были измерены при помощи времяпролетного масс-спектрометра AXIMA MALDI-TOF (Shimadzu, Japan), который оснащен вакуумным источником МАЛДИ.

Новый способ приготовления МАЛДИ образца (электро-напыление на слой матрицы), позволил существенно увеличить выход многозарядных ионов. В масс-спектре образца (*insulin-bovine*, M=5733Да) приготовленного новым методом, видны преимущественно многозарядные ионы, как в методе

электроспрей (см. рис.3а). В то же время при использовании стандартного метода пробоподготовки образца (метод высушенной капли) в масс-спектрах наблюдались преимущественно однозарядные ионы (см. рис.3в). Выход многозарядных ионов, при использовании нового способа пробоподготовки, можно объяснить если рассматривать процесс ионообразования, как просто десорбцию готовых ионов. Структура слоя матрицы существенно влияла на выход многозарядных ионов. Заметный выход многозарядных ионов наблюдался в случае слоя, состоящего из плотно упакованных макрокристалликов ( $\approx 50$  микрон).

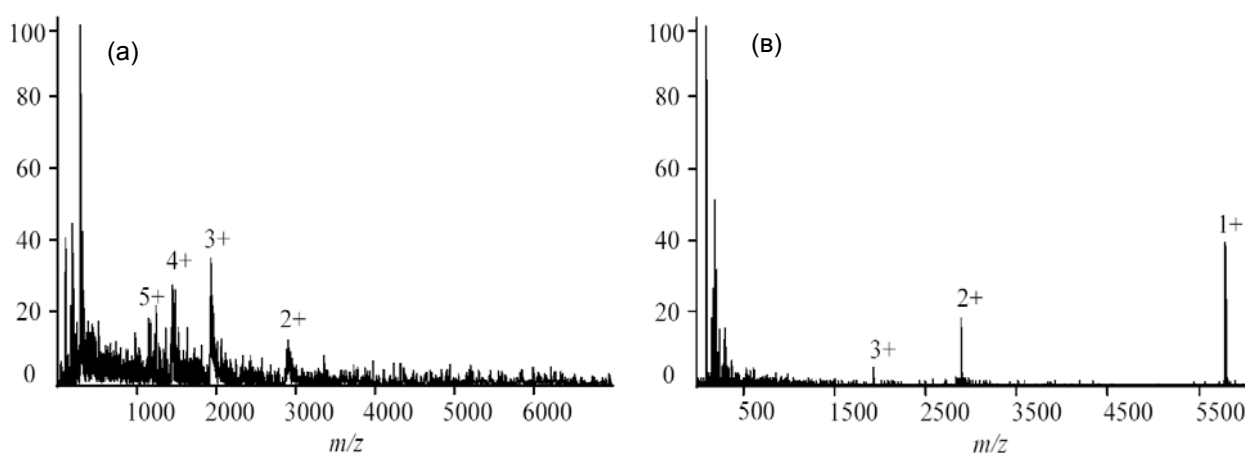


Рис. 3. Масс-спектры полученные для образца, приготовленного методом электро-напыления на слой матрицы (а) и методом высушенной капли (в).

**Третья глава** содержит описание подхода, который был разработан для исследования элементного состава гумусовых кислот при помощи масс-спектрометрии ИЦР ПФ.

Гумусовые кислоты (фульвокислоты – ФК, гуминовые кислоты -ГК) представляют собой сложную смесь. В ИЦР масс-спектрах сверхвысокого разрешения гумусовых кислот содержится большое количество близких по значению  $m/z$  и по интенсивности пиков, за счет чего происходит перекрытие изотопных кластеров (рис. 4). Точного измерения масс ( $\sim 2$ ppm) и высокого разрешения масс-спектрометра ИЦР оказывается достаточно для однозначной идентификации элементного состава только тех молекулярных ионов, масса которых не превышает 500Да.

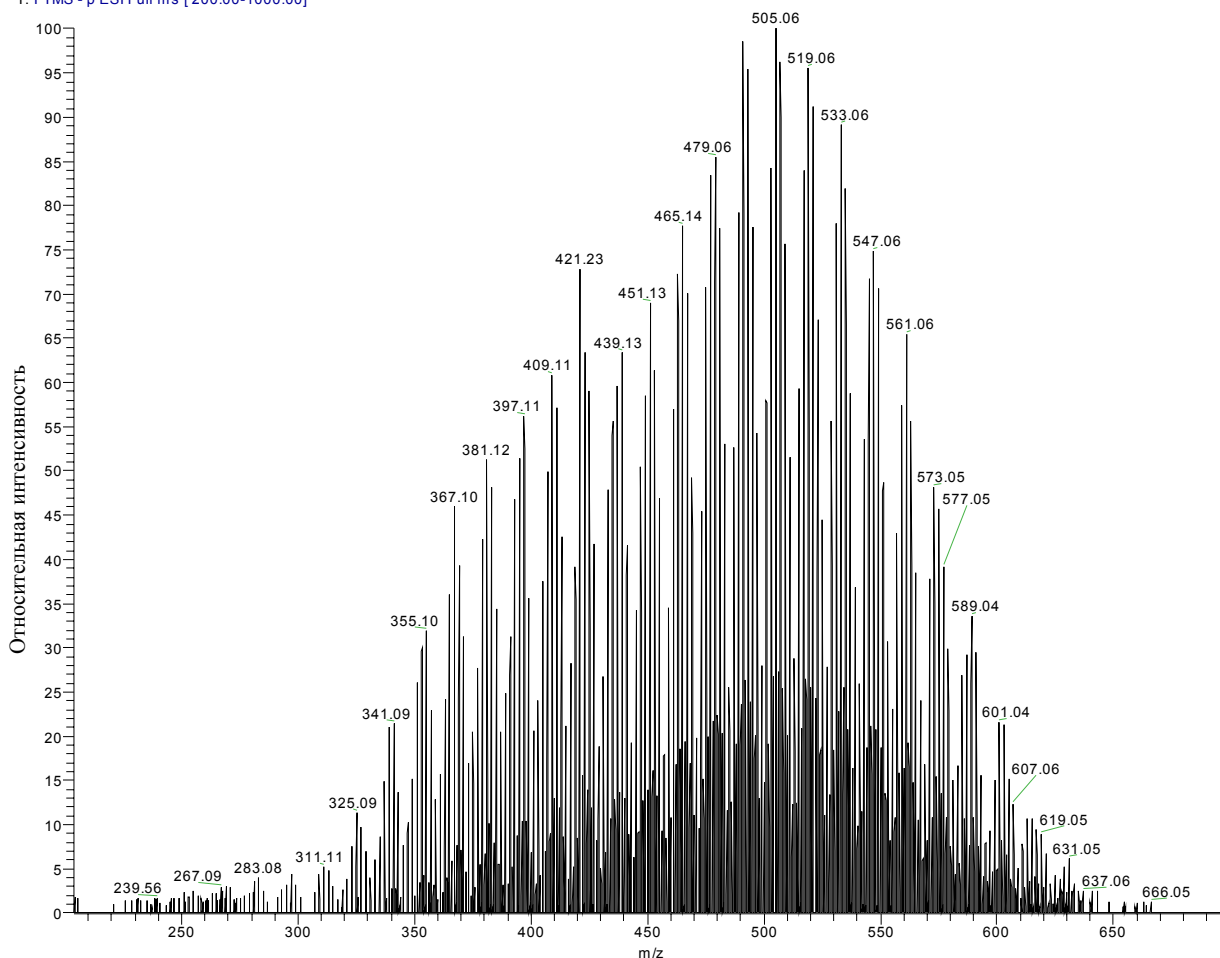


Рис. 4. ИЦР масс-спектр речных фульвокислот в режиме отрицательных ионов.

Интерпретация спектров гумусовых кислот требует применения статистической обработки, поэтому был использован метод обобщенной статистики разности масс (ОСРМ). Идентификация ионов и анализ спектров методом обобщенной статистики разности масс осуществлялись с помощью разработанного программного обеспечения FIRAN. Модульное программное обеспечение FIRAN выполняет следующие операции: 1) определение заряда ионов, основанное на симуляции распределения изотопов; 2) фильтрация входных данных на основе результатов определения заряда ионов; 3) вычисление обобщенной статистики разности масс; 4) вычисление дефектов масс Кендрика; 5) определение стехиометрических формул для фрагментов, полученных в спектре обобщенных разностей масс, и ионов в исходном масс-спектре; 6) вычисление элементного состава анализируемого образца; и 7) построение диаграмм ван Кревелена.

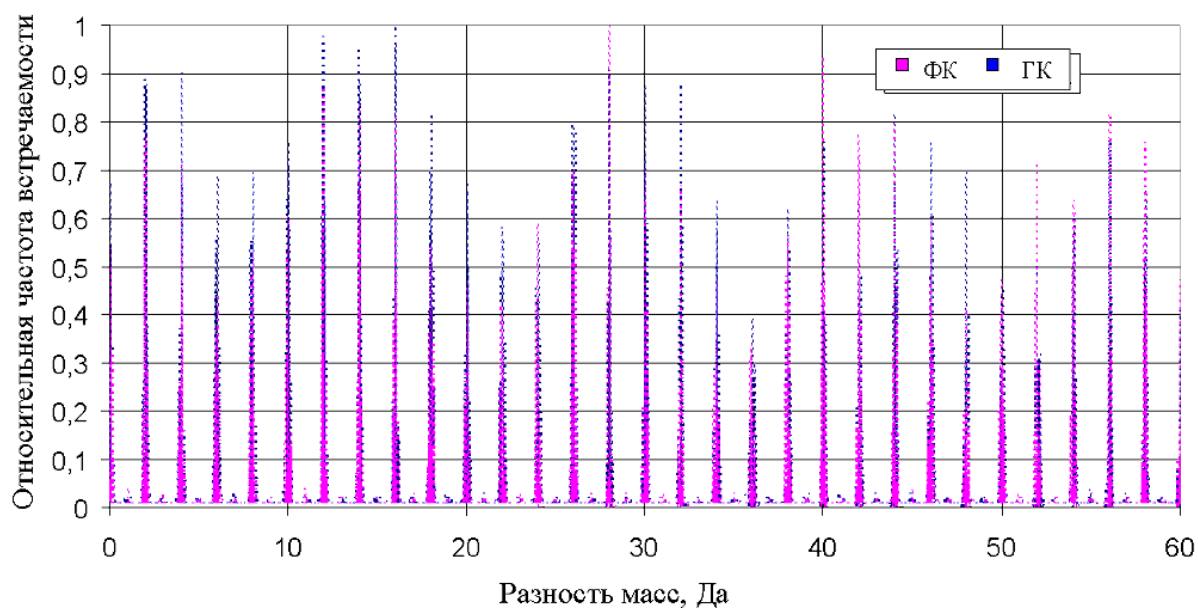


Рис. 5. ОСРМ спектры для речных (ФК) фульво- и (ГК) гуминовых кислот.

Процедура вычисления обобщенной статистики разности масс (ОСРМ) состоит из следующих шагов: 1) нахождение всех разностей масс между всеми возможными парами пиков в спектре; 2) вычисление частот встречаемости всех наблюдаемых в спектре разностей масс; 3) фильтрация для исключения разностей масс, обусловленных случайными факторами.

На рисунке 5 показаны ОСРМ спектры, полученные для речных препаратов фульво- и гуминовых кислот. Множество повторяющихся фрагментов, соответствующих интенсивным пикам в спектре обобщенной статистики разности масс, позволяет проводить определение молекулярных формул тяжелых ионов путем их соотнесения с легкими ионами, молекулярные формулы которых известны. Данный подход также может быть использован для предварительного определения элементов, входящих в состав тяжелых фрагментов или ионов, и устранения возможной неопределенности в определении формул в случае неизвестного элементного состава. Наиболее часто встречающиеся разности обычно указывают на процессы, протекавшие в ходе формирования образца (см. рис.6).

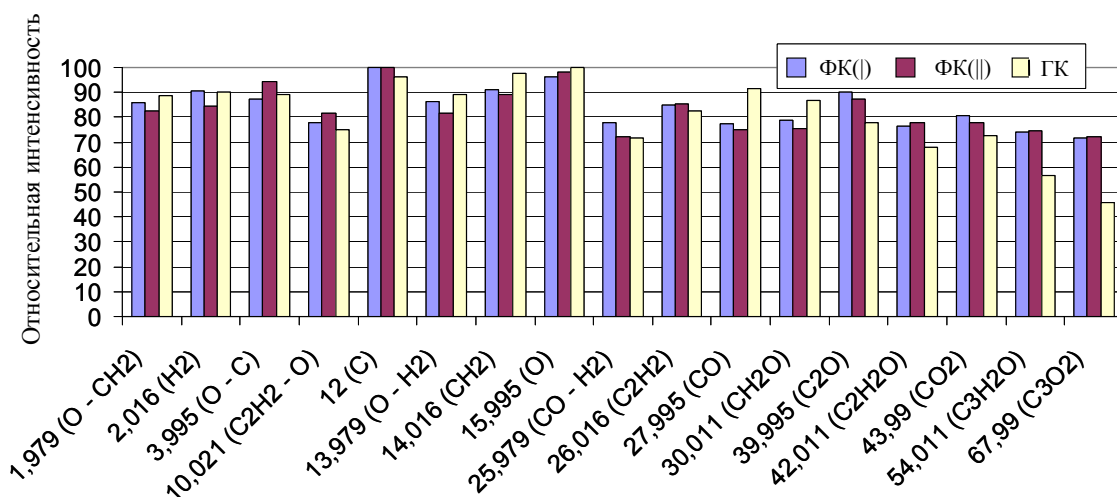


Рис. 6. Список наиболее часто встречающихся разностей (функциональных групп) в OCRM спектрах речных фульвокислот (ФК| и ФК||) и гуминовых кислот (ГК).

Полный элементный состав речных фульвокислот определялся в двух экспериментах с различными растворителями. Полученные результаты хорошо согласуются друг с другом и укладываются в следующие диапазоны: С: 54.3 - 54.7%, Н: 4.0 - 5.0%, О: 39.3 - 41.7%, и близки к результатам элементного анализа: С - 52.34, Н - 4.36, О - 42.98. Элементный состав для гуминовых кислот, определенный при помощи масс-спектрометрии ИЦР ПФ, показывает содержание углерода заметно больше (62.9 %), а кислорода ниже (31.2%), по сравнению, с результатам элементного анализа (С - 52.63% и О - 42.04%). Причиной данного феномена может служить различие в эффективности ионизации фракций фульво- и гуминовых кислот при использовании метода электроспрей: компоненты фульвокислот ионизируется легче, чем компоненты гуминовых фракций.

**В четвертой главе** описывается хромато-масс-спектрометрическая методика, разработанная для анализа протеома биологических жидкостей человека (моча, КВВ), и применение метода точных массово-временных меток, для поиска и идентификации белков, содержащихся в моче человека. Также описывается подход развитый для поиска пост-трансляционных модификаций .

Анализ биологических жидкостей человека строился на классическом подходе, который часто используется в протеомике и состоит из следующих этапов: (1) отбор пробы содержащей белки; (2) очистка, концентрирование и предварительное разделение смеси белков; (3) энзиматическое расщепление белков – получение смеси пептидов; (4) хромато-масс-спектрометрический анализ смеси пептидов; (5) поиск и идентификация белков.

Хромато-масс-спектрометрическая методика для анализа смеси пептидов была разработана на базе нанопоточного высокоэффективного жидкостного хроматографа (нано-ВЭЖХ) Agilent 1100 (Agilent, США) и масс-спектрометра Finnigan LTQ FT (Thermo Electron, Бремен, Германия). Для соединения нано-ВЭЖХ с масс-спектрометром использовался наноспрейный ионный источник, который был разработан и собран в лаборатории.

Разделение смеси пептидов, при помощи нано-ВЭЖХ, проводилось методом градиентного элюирования – подвижная фаза *B* (80% ацетонитрил + 20% вода + 0,1% муравьиной кислоты) изменялась от 3% до 35% в течении 120 минут, скорость потока подвижной фазы была 0,3мкл/мин.

Масс-спектрометрический анализ фракций пептидов осуществлялся при помощи программы Xcalibur (Thermo Electron, Бремен, Германия) в 2-х стадийном режиме автоматического измерения спектров (см. рис.7). На первой стадии в масс-спектрометре ИЦР ПФ измерялись точные массы пептидов в диапазоне  $m/z$  300-1600, с разрешением  $R=25000$  для  $m/z$  400 (число ионов в ячейке ИЦР:  $5 \cdot 10^6$ ). На второй стадии из ИЦР масс-спектра выбирались три максимальных пика, для которых производилась либо столкновительно индуцированная фрагментация (CID), либо фрагментация, при захвате медленных электронов (ECD). Фрагментация CID и измерение спектров CID фрагментов происходили в линейной квадрупольной ионной ловушке (число ионов:  $3 \cdot 10^4$ ). Фрагментация ECD и измерение спектров ECD фрагментов осуществлялись в ИЦР ячейке (число ионов:  $5 \cdot 10^5$ ). В режиме автоматического 2-х стадийного анализа пептиды, для которых фрагментация уже была проведена, динамическое исключались из рассмотрения на 30 секунд.

Данные хромато-масс-спектрометрического анализа обрабатывались при помощи программы BioworksBrowser 3.1 SR1 (Thermo Electron, Бремен, Германия), которая формирует список из точных значения масс пептидов и масс их фрагментов. Данный список используется для поиска и идентификации белков по базе данных NCBI nr (Comprehensive, non-identical protein database), при помощи программы Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.0.04).

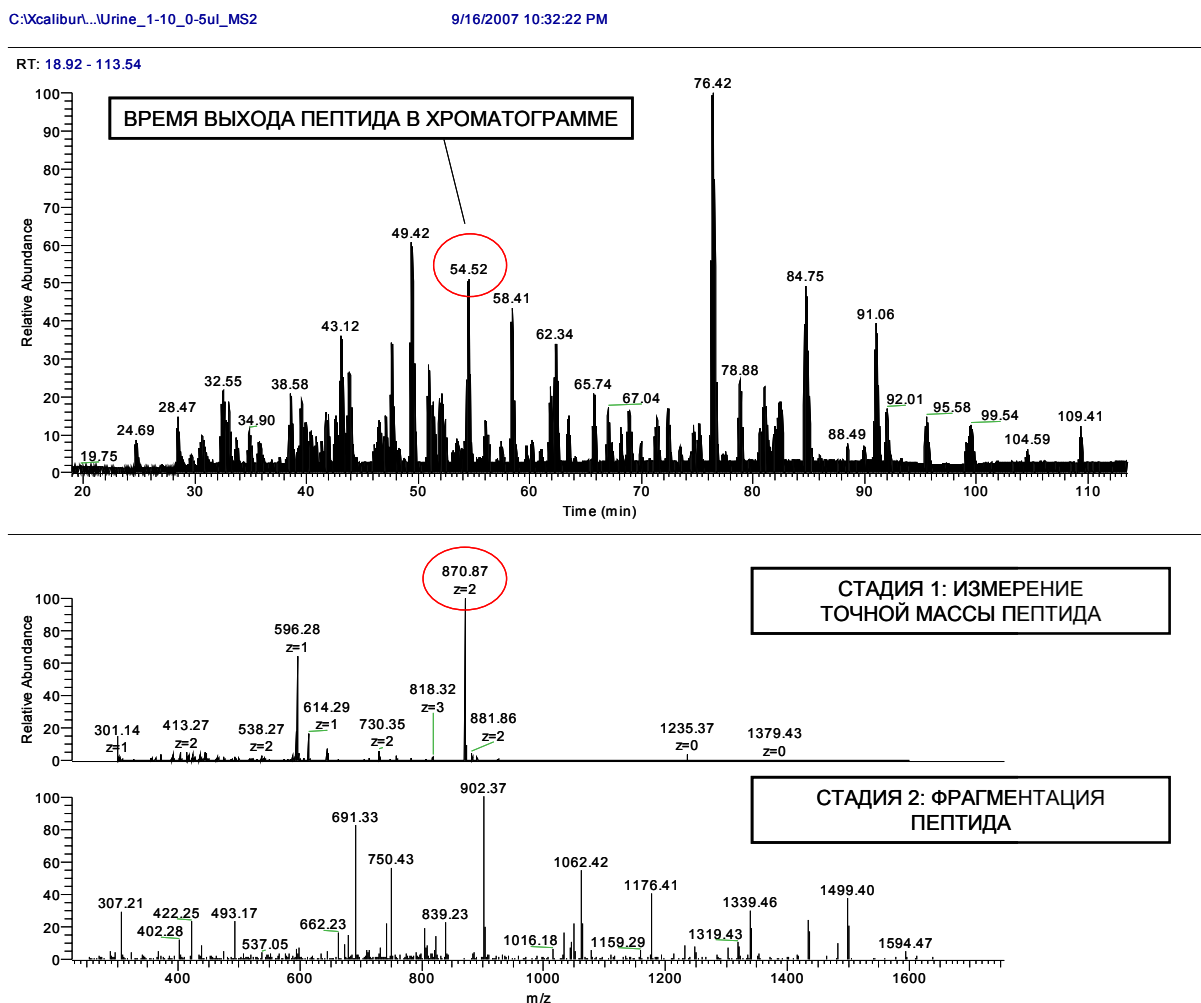


Рис. 7. Масс-хроматограмма полученная для пробы мочи (вверху). СТАДИЯ 1: измерение ИЦР масс-спектра в момент времени, выделенный на хроматограмме (в центре). СТАДИЯ 2: фрагментация (ECD или CID) самого интенсивного пика, выделенного в ИЦР масс-спектре, и измерение спектра фрагментов (внизу).

Было идентифицировано около 200 белков при анализе проб мочи. В одном хромато-масс-спектрометрическом прогоне удается идентифицировать около 120 белков. Приготовление пробы мочи и способ фрагментации пептидов влияют на количество и список идентифицированных белков (см. рис.8).

В одном хромато-масс-спектрометрическом эксперименте в пробе КВВ удается идентифицировать около 20 белков. Набор идентифицированных белков разный для проб КВВ, собранных от разных пациентов, и зависит от способа сбора пробы КВВ.(см. рис.9).

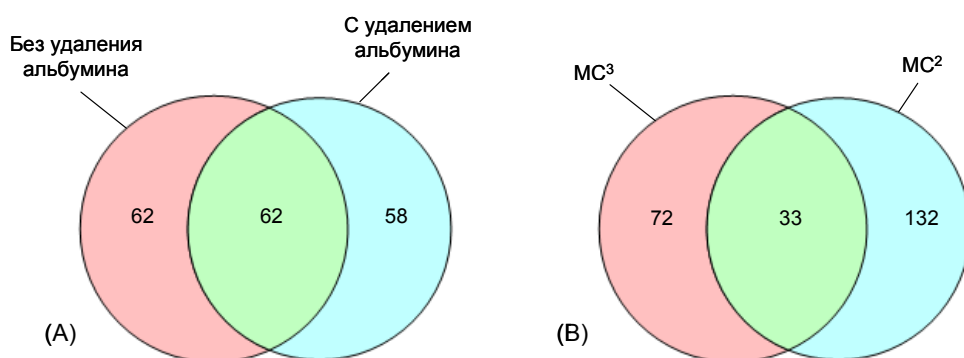


Рис. 8. Диаграммы сравнения количества белков идентифицированные в моче человека при разных методах приготовления образца(А) и фрагментации пептидов(В). Цифрами указано количество идентифицированных белков.

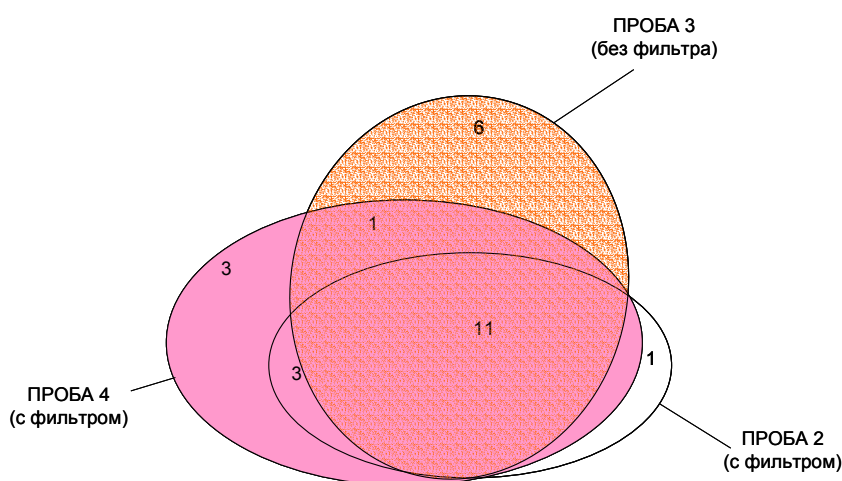


Рис. 9. Диаграмма сравнения количества белков, найденных в трех разных пробах КВВ. Цифрами указано количество идентифицированных белков.

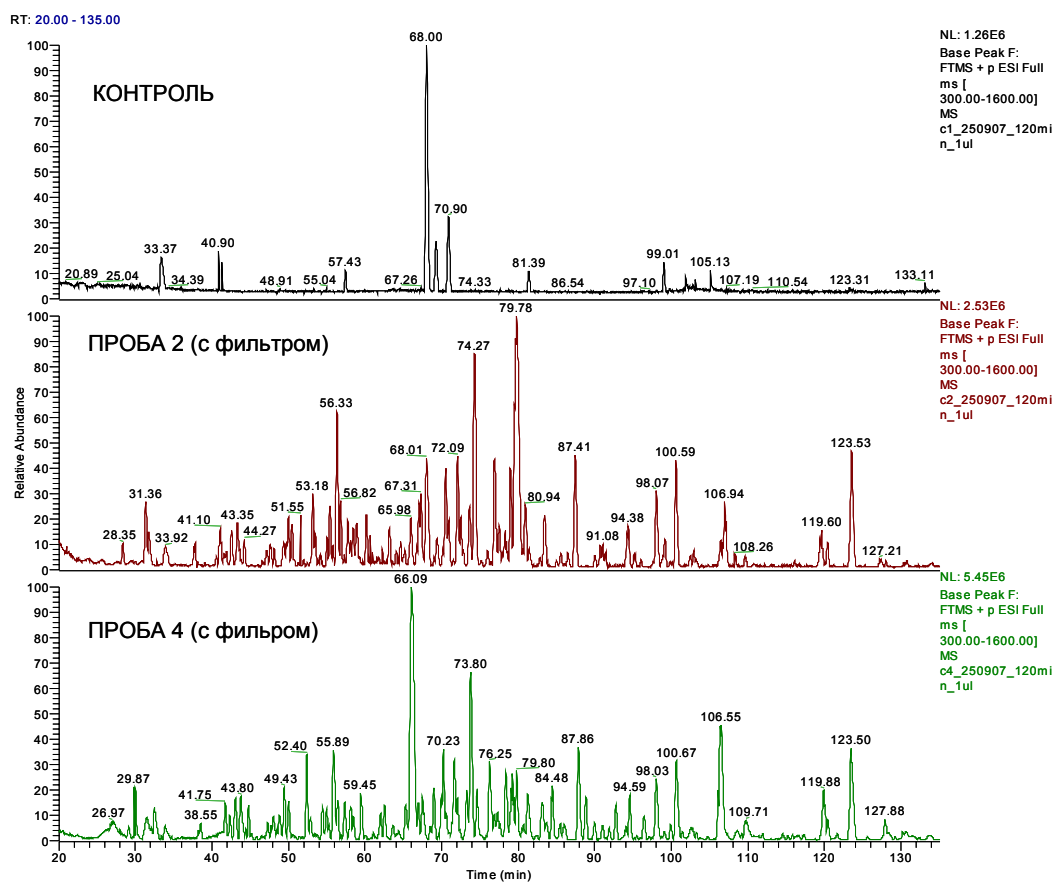


Рис. 10. Масс-хроматограммы полученные для образца-контроля и 2-х проб КВВ, собранных от разных пациентов.

По интенсивности пиков в масс-хроматограммах, полученных при анализе проб КВВ, возможно сравнение профилей экспрессии белков у разных пациентов (см. рис. 10).

Метод точных массово-временных меток подразумевает под собой создание базы данных точных массово-временных меток и использование данной базы данных для поиска и идентификации белков в хромато-масс-спектрометрических экспериментах, без применения методов фрагментации. Данная идеология была использована для анализа проб мочи человека. На первой стадии производился хромато-масс-спектрометрический анализ для предварительной идентификации пептидов, содержащихся в пробе. Из списка идентифицированных пептидов формировалась база данных, содержащая массы (подсчитанные по идентифицированной аминокислотной последовательности) и соответствующие (измеренные) времена удержания пептидов в хроматографической колонке. Далее эта база данных сравнивалась с

результатами хромато-масс-спектрометрического эксперимента с использованием масс-спектрометра ИЦР ПФ, в котором проводились измерения точных масс зарегистрированных пептидов при полученных ранее временах удерживания. В результате процедуры сравнения формировалась база данных точных массово-временных меток, которая может использоваться для поиска и идентификации белков из мочи человека по точной массе пептидов, входящих в состав белка, и временам удерживания данных пептидов в хроматографической колонке (Рис. 11). Данная база данных может позволить идентифицировать большее количество белков во всех последующих хромато-масс-спектрометрических экспериментах.

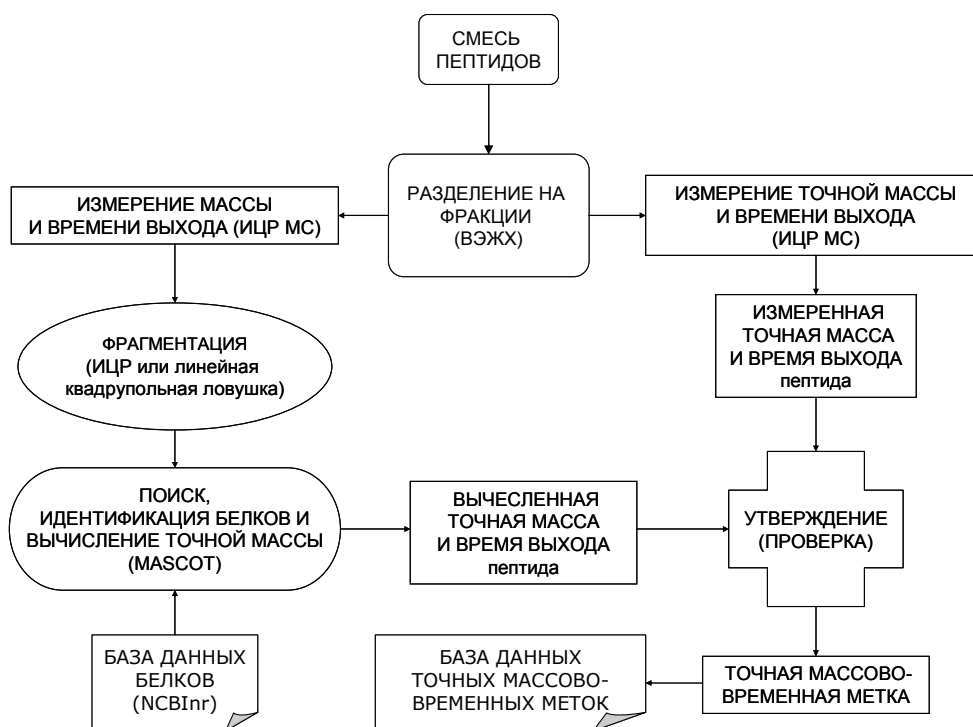


Рис. 11. Принцип формирования базы данных точных массово-временных меток.

Поиск пост-трансляционных модификаций в белках, содержащихся в моче человека, осуществлялся с использованием нового алгоритма, предложенного группой Певзнера. Данный подход позволил находить не только известные модификации, но так же и любые другие, заранее неизвестные модификации. Методика поиска основана на предположении, что в смеси имеются как модифицированные белки, так и их немодифицированные варианты. Процедура поиска модификаций строится следующим образом: проводится

предварительный поиск по базе данных в результате которого идентифицируются немодифицированные белки, присутствующие в смеси. Далее в найденных немодифицированных белках, ищутся произвольные модификации методами кластеризации похожих масс-спектров (в спектрах должны совпадать хотя бы четыре пика) фрагментации пептидов, входящих в состав белков, и статистики разностей масс похожих пептидов (у которых оказались похожие масс-спектры фрагментов). Модификациями считались разности масс похожих пептидов. Найдя характерные модификации осуществлялся поиск по обычным базам данных, с указанием найденных модификаций. Такой подход позволил повысить количество идентифицированных белков, содержащихся в моче человека, и определить основные модификации, которые присутствуют в протеоме мочи человека (см. Рис.12).

Mass (N)	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y (C)		
-18	0	0	0	6	0	3	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	1	2	0	0		
-17	65	0	0	4	14	0	0	1	5	5	3	1	10	13	75	1	12	4	8	0	4	1
-14	0	0	3	0	1	0	0	0	2	2	2	0	0	1	0	1	1	1	2	0	1	2
5	1	1	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	
14	1	1	6	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
16	5	3	0	4	0	0	0	0	1	0	3	10	0	0	1	2	0	6	2	0	0	2
22	0	7	0	15	13	9	10	1	6	0	3	0	2	8	5	0	16	8	3	0	0	0
28	45	3	0	7	5	7	10	7	6	2	26	8	4	5	6	7	10	15	9	3	6	1
38	0	1	0	2	1	0	2	0	2	0	0	0	0	1	1	0	0	1	3	0	0	0
76	2	4	20	2	1	1	5	0	3	0	2	0	2	3	2	1	7	0	2	0	2	0
78	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	1	0	0	0
85	8	3	6	0	5	1	0	2	0	1	0	0	1	0	2	0	4	0	5	0	5	0
104	2	1	3	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
114	1	0	10	1	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	1	0
117	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
119	1	0	1	0	3	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
126	0	0	6	0	0	0	2	0	0	1	1	0	0	0	0	2	4	0	0	0	5	4
129	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	7	0	0	0	0	3	6	6	0	0	0
168	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
185	2	0	2	1	1	1	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0
192	5	0	5	0	4	0	0	0	0	0	1	0	5	0	5	0	0	0	0	0	0	0
207	0	0	0	2	1	0	2	2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
209	12	8	39	2	6	6	15	0	3	1	4	1	6	3	2	2	9	3	4	0	4	2

Рис. 12. Статистика пост-трансляционных модификаций аминокислот для протеина мочи человека (Вертикальная колонка слева – масса модификации, горизонтальная колонка сверху – список аминокислот). Частота встречаемости модификации указана цифрами и выделена цветом.

**В заключении** приводятся основные выводы:

- Разработаны методы точного измерения масс многоатомных молекул биологического происхождения с помощью масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье.
- Эти методы применены для анализа сложных систем: протеом человеческих жидкостей, гумусовые кислоты. Показано, что в случае протеома мочи человека удается идентифицировать до 120 белков в одном хромато-масс-спектральном прогоне. В случае конденсатов выдыхаемого воздуха человека удается определить до 30-ти белков и сравнить профили экспрессии белков.
- Предложен способ пробоподготовки образца, позволяющий увеличить выход многозарядных ионов в методе МАЛДИ.
- Создана база данных точных массово-временных меток для исследования протеома мочи человека. База данных может использоваться для быстрого поиска и идентификации белков без применения методов фрагментации – идентификация производится по точной массе пептидов и временам их удерживания в хроматографической колонке.
- Новый метод для поиска пост-трансляционных модификаций позволил значительно снизить время поиска и определить наиболее часто встречающиеся пост-трансляционные модификации белков, содержащихся в моче человека.
- С использованием масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье и нового метода вычисления обобщенной статистики разности масс, более детально исследован элементный состав гумусовых кислот. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами традиционного элементного анализа.

## Публикации:

- 1) Куненков Э. В., Кононихин А. С., Перминова И. В., Гармаш А. В., Попов И. А., Николаев Е. Н. «Анализ гумусовых кислот методом ИЦР МС с использованием обобщенной статистики разности масс» // Третий съезд ВМСО, 2-ая Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы», 3-7 сентября 2007 г., Москва.
- 2) Erast V. Kunenkov, Aleksey S. Kononikhin, Irina V. Perminova, Andrey V. Garmash, Igor A. Popov, Eugene N. Nikolaev. Improvements in peak capacity of and molecular formula assignment to FTICR MS data attained on fractions of Humic acids // 8<sup>th</sup> European FTMS conference and Russian-German workshop, August 27- September 1, Moscow, Russia, 2007
- 3) Eugene N. Nikolaev, Igor A. Popov, Oleg N. Harybin, Alexey S. Kononikhin, Yuriy V. Borisov, In situ recognition of molecular chirality by mass spectrometry. Influence of hydration on chirality effects on dimethyltartrate cluster stability. International Journal of Mass Spectrometry. Vol. 265, Issues 2-3, 2007, 347-358.
- 4) Erast V. Kunenkov, Aleksey S. Kononikhin, Irina V. Perminova, Andrey V. Garmash, Igor A. Popov, Eugene N. Nikolaev. Complex mixtures analyses by FTICR-MS using statistics of mass differences // Proceedings of the 55<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Indianapolis, USA, 2007
- 5) Кононихин А.С., Куненков Э.В., Попов И.А., Гармаш А.В., Перминова И.В., Николаев Е.Н. Определение элементного состава гуминовых веществ при помощи масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье // Масс-спектрометрия в химической физике,

биофизике и экологии. 3-я Международная Конференция-школа, Звенигород, Россия, 16-21 Апреля, 2007.

- 6) Куненков Э. В., Кононихин А. С., Перминова И. В., Гармаш А. В., Попов И. А., Николаев Е. Н. Применение обобщенной статистики разностей масс для анализа сложных систем методом FTICR-MS // Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии. 3-я Международная Конференция-школа, Звенигород, Россия, 16-21 Апреля, 2007.
- 7) Харыбин О.Н., Згода В.Г., Кононихин А.С., Мошковский С.А., Попов И.А., Николаев Е.Н. Исследование белкового состава мочи человека // Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии. 3-я Международная Конференция-школа, Звенигород, Россия, 16-21 Апреля, 2007.
- 8) Д.М. Автономов, А.С. Кононихин, И.А. Попов, Е.Н. Николаев. Поиск пост-трансляционных модификаций методами кластеризации масс-спектров триптических пептидов и статистики разностей масс для повышения достоверности идентификации исходных белков. // Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии. 3-я Международная Конференция-школа, Звенигород, Россия, 16-21 Апреля, 2007.
- 9) Братанов Д.О., Калупов Т.Л., Кононихин А.С., Курова В.С., Анаев Э.Х., Николаев Е.Н., Варфоломеев С.Д. Протеомный анализ конденсатов выдыхаемого воздуха человека // Масс-спектрометрия в химической физике, биофизике и экологии. 3-я Международная Конференция-школа, Звенигород, Россия, 16-21 Апреля, 2007.
- 10) Е.Н. Николаев, А.С. Кононихин, В.Г. Згода, С.А. Мошковский, О.Н. Харыбин, И.А. Попов, Д.М. Автономов, И.А. Агрон, В.С. Курова, О.В.

Демина, С.Д. Варфоломеев. Разработка и применение метода точной массовой метки в масс-спектрометрии для хромато-масс-спектрометрического анализа протеома мочи // *Фундаментальные науки-медицине. Материалы конференции*, М.: Фирма «Слово», стр. 168-169, 2006 г..

- 11) Яковлева М.А., Сакина Н.Л., Кононихин А.С., Фельдман Т.Б., Николаев Е.Н., Донцов А.Е. и академик Островский М.А. Обнаружение и исследование продуктов фотоокисления флуорофора липофусциновых гранул из клеток пигментного эпителия глаза человека □ *N*-ретинилиден-*N*-ретирилэтаноламин (A2E). *БИОФИЗИКА, Доклады Академии Наук*, 2006, том 409, №3, стр. 411-414.
- 12) Kunenkov, E.V., Kononikhin, A.S., Perminova, I.V., Garmash, A.V., Nikolaev, E.N., Popov, I.A. 2006. Analysis of FTICR-MS data on humic substances and synthetic polyelectrolytes using different data processing techniques. Abstracts of the First Int. Symposium on Ultrahigh Resolution Mass Spectrometry for the Molecular level Analysis of Complex (BioGeo)Systems, 6-7 Nov. 2006, GSF, Oberschleissheim, Germany
- 13) Kunenkov, E.V., Kononokhin, A.S., Gaspar, A., Schmitt-Kopplin, Ph., Perminova, I.V., Garmash, A.V., Hertkorn, N., Popov, I.A., Nikolaev, E.N. Comparison of FTICR data on the Suwannee river humic and fulvic acids. Abstracts of the First Int. Symposium on Ultrahigh Resolution Mass Spectrometry for the Molecular level Analysis of Complex (BioGeo)Systems, 6-7 Nov. 2006, GSF, Oberschleissheim, Germany
- 14) Igor A. Popov, Sergey A. Kozin, Ivan A. Boldin, Aleksey S. Kononikhin, Eugene N. Nikolaev, Oleg N. Kharybin, Alexander I. Archakov. Recognition of individual amino acid isomeric form in peptides by FT ICR mass spectrometry. Application to Alzheimer's disease peptides. // *Proceedings of the*

54<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Seattle, USA, 2006.

- 15) A. Kononikhin, E. Nikolaev, V. Frankevich, and R. Zenobi, Letter: Multiply Charged Ions in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Generated from Electrosprayed Sample Layers, *Eur. J. Mass Spectrom.* 11, 257-260 (2005).