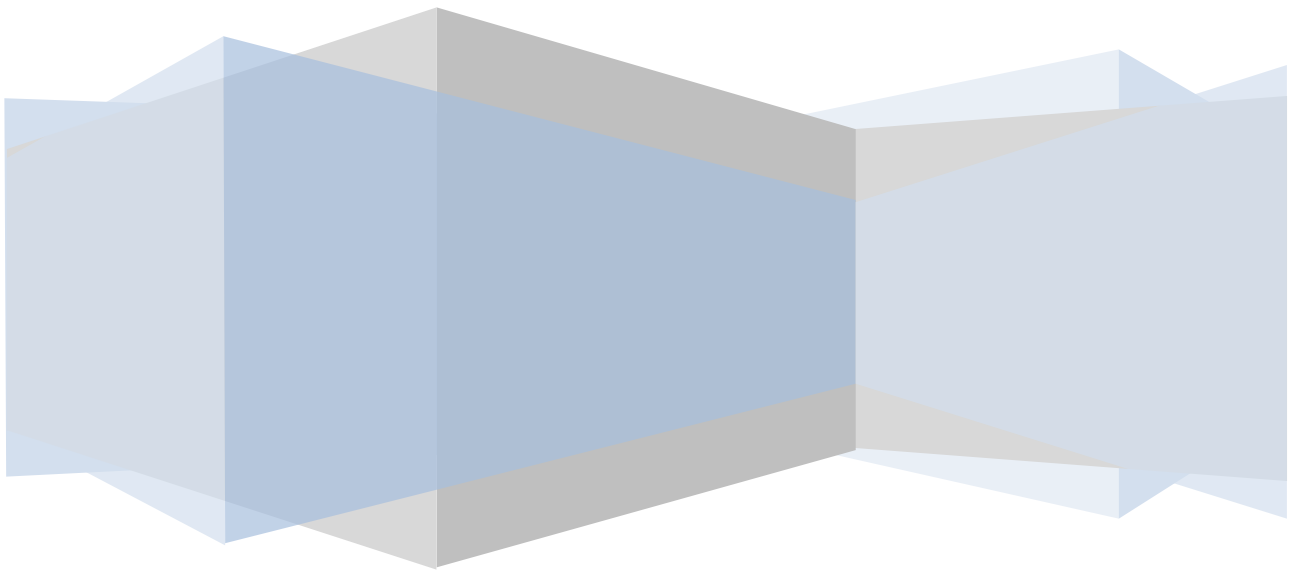


Същност и приложение на маспектрометрията за изследване на протеини и гликопротеини

**д-р Людмила Георгиева Велкова,
асистент в лаб. ХББЕ –ИОХЦФ-БАН**



ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ НА МАССПЕКТРОМЕТРИЯТА

Какво представлява масспектрометрията?

Масспектрометрията е аналитичен метод, при който смес от йони и техните фрагменти се разделят в газова фаза под действието на електромагнитно поле, в съответствие с масовите им числа m/z , където "m" е масата на молекулния йон или на неговите фрагменти, а "z" е техният заряд. Този метод се отличава с висока чувствителност и селективност, като за анализ се използват количества от порядъка на микрограм или нанограм. Това дава възможност да бъдат измерени масата на атоми, изотопни съотношения и позволява да бъдат идентифицирани вещества с много ниска концентрация в химически смеси, както и да се получи ценна информация за строежа и структурата им. Масспектрометрията се съчетава успешно с редица други методи, като газова хроматография, течна хроматография и др.

Апаратът (масспектрометър) регистрира измерените данни в масспектър, който представлява графична зависимост на относителното налягане (или интензитет I) на газообразните компоненти, като функция от техният масови числа.

Масспектърът предоставя качествена и количествена аналитична информация чрез масспектрални пикове. Екстензивното свойство на съответния масспектрален пик е интензитетът I, а интензивното свойство е стойността на масовото число m/z . За анализ се използват количества от порядъка на микрограм или нанограм.

Къде се използва масспектрометрията?

Масспектрометрията се използва както за изследователски и научни цели така и в промишлеността. Основните приложения на масспектрометрията са:

- ✓ Анализи на околната среда;
- ✓ Биотехнологии: анализ на пептиди, протеини и олигонуклеотиди, гликопротеини;
- ✓ Фармацевтика: откриване и изследване на лекарствени вещества, комбинаторна химия, фармакокинетика, лекарствен метаболизъм;
- ✓ Съдебна медицина: наркотици, експертизи и др.;
- ✓ Клинична лаборатория: анализ на хемоглобин, тестване на лекарства, допинг контрол и др.

Как масспектрометрията помага на биохимичите за изследователски цели?

- ✓ Точност в измерванията на молекулната маса;

- ✓ Реакционен мониторинг: за мониторинг на ензимните реакции, химични модификации;
- ✓ Определяне първичната структура на протеини - определяне на аминокиселинната последователност (АКП), идентификация на протеини;
- ✓ Отчитане на посттранслационните модификации;
- ✓ Протеомни анализи: Формиране на комплекс протеин-лиганд при физиологични условия, определяне на макромолекулната структура.

Принцип на действие на масспектрометъра

Основният апарат, който се използва за масспектрометрични изследвания се нарича масспектрометър. Основните части, които изграждат всички масспектрометри са три: източник на йонизация, анализатор и детектор (Фиг1).



Фиг. 1. Опростена схема на масспектрометър

Въвеждане на пробата. Методът на въвеждане на пробата в източника на йонизация често зависи от метода на йонизация и от вида на пробата. Пробата може да бъде въведена директно в източника на йонизация или да постъпи в източника на йонизация след като претърпи някакъв вид хроматографски разделяния. Най-често, пробата предварително се пречиства на високоефективна течна хроматография (HPLC), газ-хроматография (GC) или капилярна електрофореза (CE). По този начин пробата се разделя на серия компоненти, които последователно се въвеждат в масспектрометъра за индивидуален анализ.

Йонизация на пробата. Процесите в масспектрометрията се основават на йонизация на веществата в газова фаза и разпределяне на получените частиците въз основа на масата им (масово число) във вакуум. Йонизацията протича под действие на енергия, съставена с поток от е-, йони или фотони, от топлинни източници или електрически с химични реакции. Получените йони притежават различна скорост и различни електро- и магнитни свойства, въз основа на които се разделят в йонни потоци с различни масови числа. Йонните частици в потоците упражняват налягане, пропорционално на броя им.

Най-често използваните методи на йонизация са:

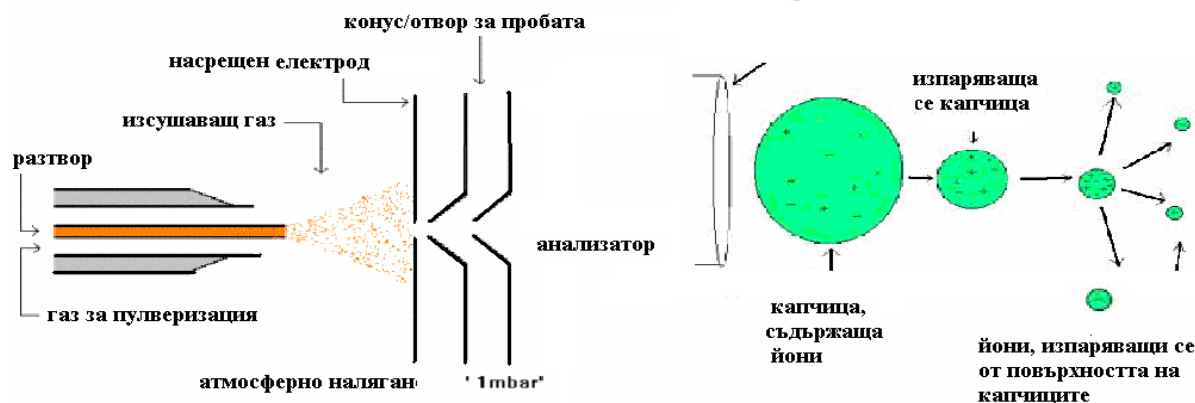
- ✓ *Йонизация чрез електронен удар. Сблъсък на електрони (EI);*
- ✓ *Химическа йонизация (CI);*
- ✓ *Електроспрей йонизация (ESI);*
- ✓ *Химическа йонизация при атмосферно налягане (APCI);*
- ✓ *Термоспрей йонизация (TSP);*
- ✓ *Йонизация в електрично поле;*
- ✓ *Йонизация чрез бомбардиране с бързи атоми (FAB);*
- ✓ *Лазерна десорбционна йонизация с помощта на матрица (MALDI)*

Най-често използваните йонизационни методи за анализ на биомолекули, като протеини, гликопротеини, олигонуклеотиди са електроспрей и наноспрей йонизацията, както и лазерна десорбционна йонизация с помощта на матрица (MALDI).

Електроспрей йонизация (ESI)

Развитието на електроспрей йонизацията за анализ на биологични макромолекули се свързва с името на Фен Джон Енет, който е награден с Нобеловата награда за химия през 2002 година.

По време на електроспрей йонизацията пробата се разтваря в летлив полярен разтворител и се изпомпва през тясна капилярка от неръждаема стомана (около 100 μm в диаметър) със скорост на потока между 1 $\mu\text{L}/\text{мин}$ и 1 $\text{мл}/\text{мин}$ (Фиг. 2А). “Електроспрей” се генерира чрез прилагане на висок волтаж (около 3000 V) на върха на капилярката. Това създава силно електрическо поле, което помага на разтворителя и пробата да бъдат елуирани от върха на капилярката под формата на аерозол от високо заредени капчици. Това се подпомага от поток горещ газ (най-често азот - нар. още изсушаващ газ), излизащ от капилярката и насочващ струята по посока на анализиращата част на апарата. Заредените капчици намаляват своя размер, тъй като разтворителя се изпарява под влиянието на потока от загрят азот, който излиза от йонизационния източник (Фиг. 2Б). Накрая заредените йони се освобождават от разтворителя, преминават през специален отвор, в камера, която е под вакуум, от която след това биват насочени през малък отвор към анализиращия дял на апарата, където молекулите се разделят въз основа на молекулните им маси. Разновидност на ESI е наноспрей йонизацията, която се провежда при ниска скорост на потока. Най-голямото приложение на тази техника е за анализ на смес от хидролизирани протеини.

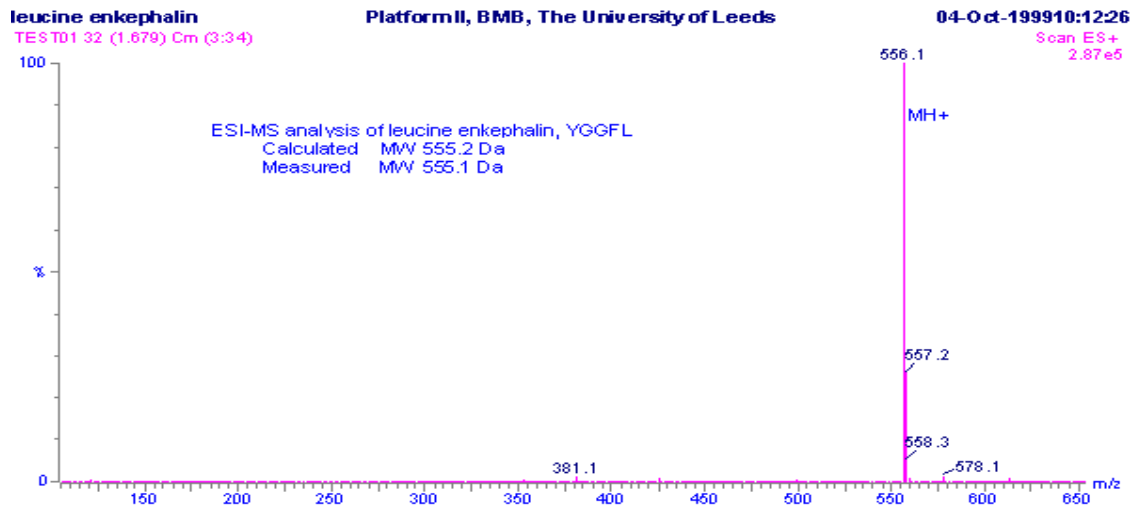


Фиг. 2. А) Електроспрей йонизационен източник и (Б) йонизационен процес.

Едно от предимствата на тази техника на йонизация е, че при атмосферно налягане може да бъдат генерирани положително и отрицателно заредени йони. Електроспрей йонизацията и наноспрей йонизацията са познати, като “мек” метод на йонизация. Пробата се йонизира чрез протониране $[M+H]^+$ или депротониране $[M-H]^-$ с много малък излишък на енергия. ESI и наноспрей йонизацията създават един и същи тип спектрални данни за пробите. В режим на положителна йонизация често се добавя минимално количество мравчена киселина, за да се подпомогне протонирането на молекулите на пробата. В режим на отрицателна йонизация се прибавят минимално количество от разтвор на амоняк или летлив амин, за да се подпомогне депротонирането на молекулите на пробата. Протеините и пептидите се анализират обикновено при положителна йонизация, а захаридите и олигонуклеотидите - под отрицателна йонизация. Преди провеждане на анализ се калибрира m/z скалата, чрез анализиране на стандартна проба от сходен тип.

Обикновено пробите (M) с молекулни маси до 1200 Да, дават единично заредени молекулно-свързани йони На фиг 3. е представен пример на такъв вид анализ на пента-пептид YGGFL (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu). Молекулната формула на това съединение е $C_{28}H_{37}N_5O_7$, а изчислената моноизотопна молекулна маса 555.2692Да. Доминиращ в спектъра е единично зареден йон ($z = 1$) при m/z 556.1, което е в съответствие с протониран молекулен йон $[M + H]^+$. От тук измерената молекулна маса е 555.1 Да, което е в добро съгласие с теоретичната стойност (Фиг. 3). Спектърът съдържа също йони при m/z 578.1, т.е. с 23 Да повече спрямо очакваната молекулна маса. Тези данни показват наличие на Na- йони и образуване на $[M + Na]^+$. Някои от молекулите на пробата, вместо да бъдат йонизирани чрез протониране могат да бъдат йонизирани чрез прибавяне на Na-катиони. Други често използвани йони, които се добавят са K^+ катиони (+39) и NH_4^+

катиони (+18) в режим на положителна йонизация и СГ аниони (+35) в режим на отрицателна йонизация.

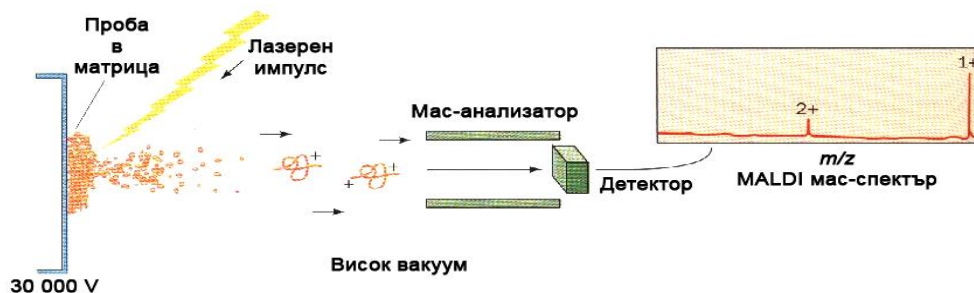


Фиг. 3. ESI-MS m/z спектър на пептид представен като $[M + H]^+$ при m/z 556.1.

Лазерна десорбционна йонизация с помощта на матрица (MALDI)

Лазерната десорбционна йонизация с помощта на матрица (MALDI) е открита през 1988 г. от Михаел Карас и Франц Хиленкамп, като революционен метод на йонизация и масспектрометричен анализ за големи биомолекули. MALDI се използва при термолабилни нелетливи органични съединения и успешно се използва за анализ на протеини, пептиди, гликопротеини, олигозахариди и олигонуклеотиди.

Методът MALDI, се основава на бомбардирането на молекулите на проба с лазерна светлина, при което се постига йонизация (Фиг. 4).



Фиг. 4. Обща схема на анализ с MALDI масспектрометър.

Пробата предварително се смесва с високо абсорбиращо съединение-матрица. Матрицата трансформира лазерната енергия в енергия на възбуждане на пробата, което води до разпръскване на йоните на анализа и матрицата от повърхността. По този начин енергетичният трансфер е ефикасен и също така молекулите на анализа са пощадени от излишно количество енергия, която в противен случай би разрушила пробата. Най-разпространените MALDI

масспектрометри работят с пулсов азотен лазер при дължина на вълната 337 nm, при което пробата с ниска концентрация се смесва с матрицата.

Механизмът на MALDI все още не е напълно разбран, но се предполага, че включва следните стъпки:

- ✓ Формиране на плътен разтвор;
- ✓ Възбуждане на матрицата;
- ✓ Йонизация на анализа.

Формиране на плътен разтвор - Молекули на анализиранията смес са разпределени равномерно с матрицата, така че са напълно изолирани една от друга. Това е необходимо, за да може матрицата да формира хомогенен плътен разтвор.

Пробата, се разтваря в подходящ летлив разтворител, обикновено в трифлуороцетна киселина, в случай че се използва положителна йонизация, с концентрация 10 pmol/μl. Предварително 1-2μL от пробата с ниска концентрация, се смесва с високо абсорбиращо съединение – матрица, при което се образуват кристали. Сместа от матрицата и пробата се нанасят на метална пластина на определени за целта позиции и се оставя да изсъхне, преди да бъде въведена във вакуум пространството на масспектрометъра.

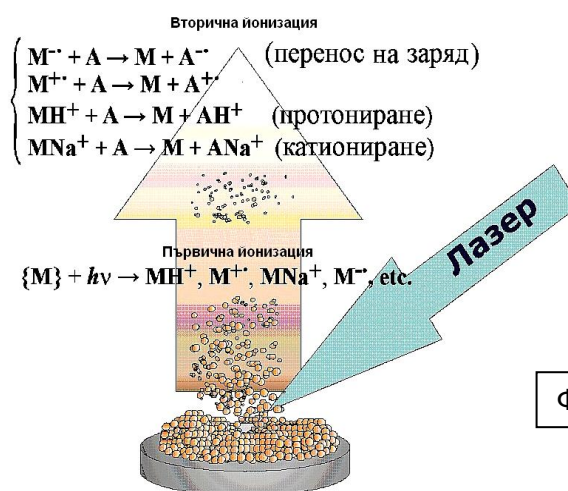
Таблица 1. Най-използваните матрици за MALDI анализи

α-циано-4-хидрокси канелена к-на в 50:50 ACN: H ₂ O с 0.1% TFA	протеини, олигозахариди	337 nm
наситен разтвор на 2,5-дихидрокси бензоена киселина (DHB)	протеини, олигозахариди, олигонуклеотиди, сулфонови к-ни	337, 355 nm
2,5-дихидрокси бензоена киселина и 2-хидрокси-5-метокси безнзоена киселина в съотношение 9:1	Олигозахариди, гликопротеини	337 nm
3-хидрокси пиколинова к-на	олигонуклеотиди, гликопротеини	266, 355 nm
Никотинива к-на	протеини, олигонуклеотиди, гликопротеини,	266 nm
наситен разтвор на синапена киселина в 50:50 ACN: H ₂ O с 0.1% TFA	протеини, индустриални полимери	337, 355 nm
6-азо-2-тиотиамин	кисели гликани	337 nm
2,4,6-три-хидрокси-ацето-фенон (THAP)	кисели гликани (съдържащи сиалови монозахаридни остатъци)	355 nm

Възбуждане на матрицата - лазерната енергия, която облъчва плътната фаза, се абсорбира от матрицата, причинявайки бързо вибрационно възбуждане, което довежда до оформиране на клъстери, изградени от една молекула от анализа, заобиколена от неутрални и възбудени молекули на матрицата. Матрицата

трансформира лазерната енергия в енергия на възбуждане на пробата, което води до разпръскване на йоните на пробата и матрицата от повърхността и впръскване в анализатора

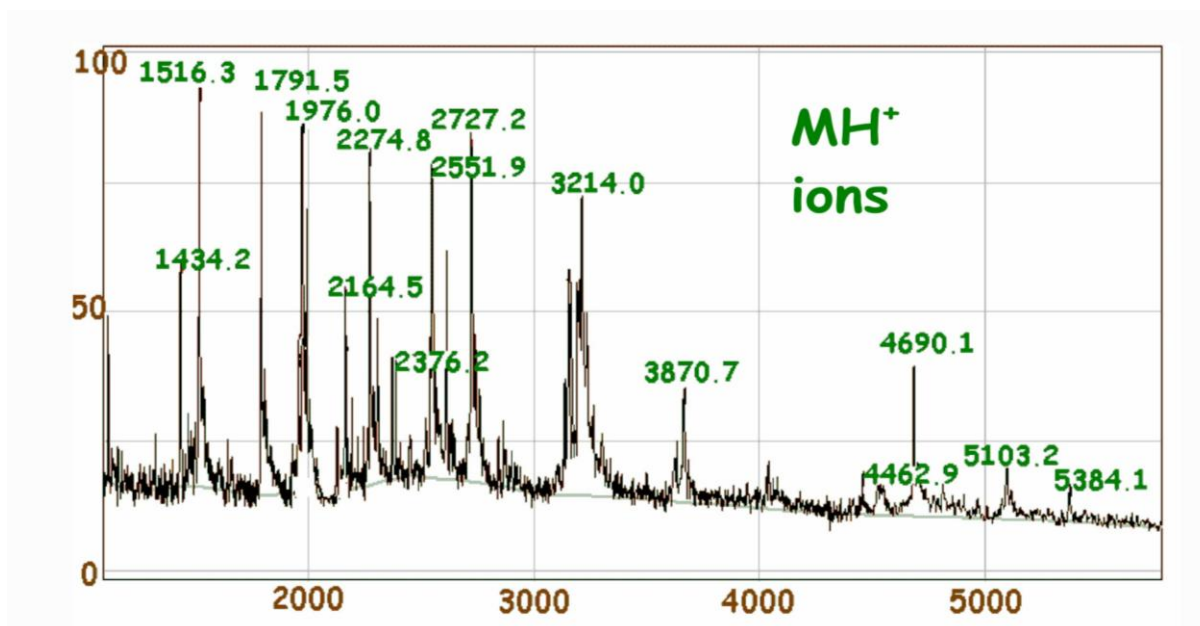
Йонизация на анализа - Молекулите на анализиранията смес могат да бъдат йонизирани чрез обикновено протониране, вследствие на фото-възбуждане на матрицата (Фиг.5).



Фиг.5. Схема на йонизация с MALDI.

След облъчването се наблюдава разпръскване на матрица-аналит в облак. Тази реакция на йонизация протича много бързо и се осъществява за десети от наносекундата. При това възбуждане на молекулите се постига формирането на типичния вид йони $[M+X]^+$, където $X = H, Li, Na, K$ и т.н. Понякога могат да се формират мулти-заредени йони, като ди-мери и три-мери $[NM+X]^{n+}$. Отрицателните йони $[M-H]^-$ се формират при протичане на реакцията, включваща депротониране на матрицата и след взаимодействие с фото-електрони се получават основните молекулни йони $[M]^-$. Това е типичният начин за създаване и охарактеризиране на MALDI-спектрите, съдържащ високи и ясни сигнали за йони от типа $[NM+X]^{n+}$. MALDI представлява “мек” метод за йонизация, тъй като генерира предимно единично заредени молекулно свързани йони, поради което спектрите са относително лесни за интерпретация.

В режим на положителна йонизация, протонираните молекулни йони $(M+H^+)$ обикновено са преобладаващи, въпреки че могат да бъдат съпътствани от добавки на соли, следи от двойно заредени молекулни йони, които имат приблизително половината от m/z стойността на основния йон и/или следи от димерни йони с приблизително два пъти по-висока m/z стойност. Положителната йонизация най-вече се използва за анализи на протеини и пептиди (Фиг.6).



Фиг. 6. MALDI MS-спектър на положителна йонизация на смес от пептиди използвайки матрица от 4-хидрокси- алфа-циано-келелена киселина.

В режим на отрицателна йонизация, най-разпространени са обикновено депротонираните молекулни йони ($M-H^-$), съпътствани от определено количество соливи добавки и следи от димерни или двойно заредени йони. Отрицателната йонизация може да се използва за анализ на олигонуклеотиди и олигозахариди.

MALDI се използва особено успешно в биохимията за анализ на протеини, пептиди, гликопротеини, олигозахариди и олигонуклеотиди. Методът се използва често и е сравнително толерантен към буфери и други добавки. Точността на измерване зависи от вида и изпълнението на анализатора на маспектрометъра, но с повечето модерни апарати може да се измерват маси с точност до 0.01% от молекулната маса на пробата.

Някои от възможностите на MALDI маспектрометрията, както и предимствата на метода са описани по-долу:

- Анализът може да бъде проведен бързо в рамките на няколко минути.
- Общото количество протеин, необходимо за провеждане на анализа е съвсем малко, обикновено от 1-10 pmol;
- Обичайните биохимични добавки, като буферите, солите, глицерин, представители на хелати, определени детергенти и т.н. не влияят върху анализа;
- Анализ на протеини;
- Дава възможност да бъдат измерени настъпилите изменения, вследствие на пост-транслационни модификации на протеините;

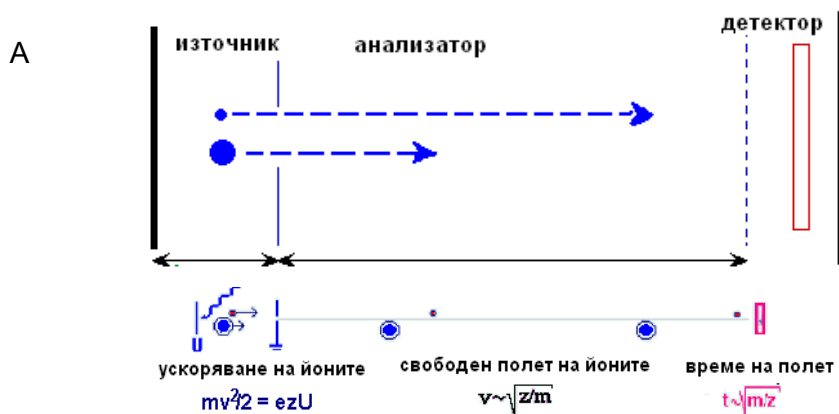
- Могат да бъдат получени масспектри от комплексна смес от протеини и пептиди и да бъдат добре интерпретирани;
- Подходящ е за анализиране на протеини с молекулна маса по-голяма от 1000 Да до около 500 кДа;

Мас-анализатори. Образуваните в източника на йонизация йони попадат в анализатора, чиято главна функция е да раздели и подреди тези йони според тяхното масово число. Поради широкият спектър на приложение на масспектрометрията, на пазара се предлагат различни видове масспектрометри, които се усъвършенстват непрекъснато. Основните масанализатори са използвани в съвременната масспектрометрия са:

- ✓ време на летене (TOF);
- ✓ квадруполни и техните производни;
- ✓ квадруполни с йонен капан (QIT);
- ✓ квадруполни-линейни с йонен капан (LIT);
- ✓ резонансен масспектрометър на Фурие (FT-ICR).

Има голямо разнообразие от масанализатори, но по-известните са тези, които включват TOF-анализатори (time-of-flight) (време на прелитане), магнитни сектори и квадруполен анализатор с един, два или три квадрупола.

TOF-анализаторите разделят йоните според техните m/z отношения, като измерват времето, което е необходимо на йоните да пропътуват през област свободно поле, известна като тръба за **летене**. По-тежките йони са по-бавни от по-леките такива. В анализатора се отчита времето на прелитане на йоните в тръбата и в зависимост от посоката им на движение той работи в два режима: линеен и рефлекторен (Фиг.7).



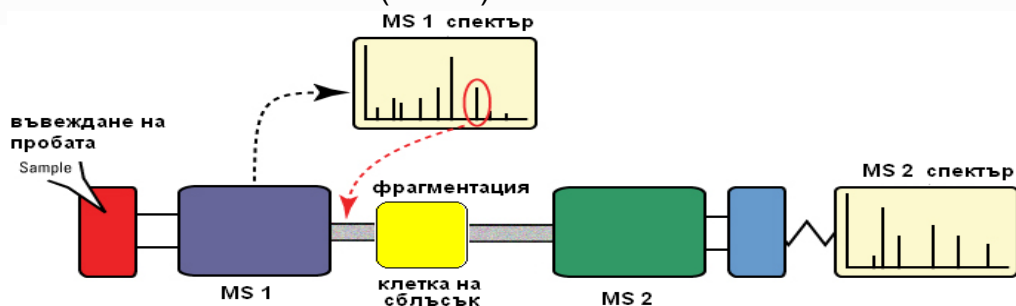


Фиг. 7. А) MALDI-TOF в линеен и Б) рефлектoren режим на измерване.

При показания на фиг. 7А, линеен режим на измерване, йоните преминават в една посока през анализатора, като се разпределят в зависимост от съотношението m/z на детектора. При рефлектoren режим на измерване, йоните прелитат и се отразяват от рефлектора, при което изминават по-дълъг път, което дава възможност за по-точното им разпределяне според m/z от детектора (Фиг.7 Б). Линеен режим на измерване е подходящ за анализ на биомолекули с маси 3-500kDa, а рефлектoren режим се използва за анализ на йонни фрагменти с маси в обхвата 300-5000 Da.

Тандем маспектрометрия (MS-MS): информация за структурата на биомолекули

Тандем маспектрометрията обикновено използва два мас-анализатори разделени от клетката на сблъсък (Фиг. 8).



Фиг. 8. Схема на тандем-мас-спектрометрия (MS/MS). Пробата се инжектира, йонизира в първия анализатор MS1 и след това се анализира в MS-режим. Йоните се избират селективно, подлагат се на фрагментиране в клетката на сблъсък и се анализира чрез втория анализатор MS2. Детекторът отчита MS/MS-спектър.

Първият анализатор се използва като мас- филтър, за да се изолира един молекулен йон, които да влезе в клетката на сблъсък, където ще бъде индуцирана неговата фрагментация. В клетката на сблъсък постъпват само пептиди с еднаква маса. В следствие на дисоциация индуцирана от сблъсък настъпва фрагментацията им. Получените фрагментни йони се анализират директно във втория масанализатор, когато се измерва тяхната молекулна маса в MS/MS режим. По този начин се получава много ценна структурна информация, за

аминокиселинни последователности на пептиди и/или за структурата гликопептиди. Това позволява, както измерване масата на пробата, така и фрагментирането ѝ вътре в анализатора, и анализиране на получените дъщерни йони.

Анализаторите могат да бъдат от един и същ или от различни видове, като най-използваните комбинации са:

- ✓ TOF- TOF;
- ✓ Троен квадрупол;
- ✓ Магнитен сектор - Магнитен сектор;
- ✓ Магнитен сектор – квадрупол;
- ✓ Квадрупол – TOF (време за прелитане).

Най-голямо приложение имат маспектрите включващи единичен квадрупол ESI-MS, MALDI-TOF-MS с PSD, тройни квадруполни ESI-MS/MS, ESI-TOF-MS, MALDI-TOF-TOF и хибридни Q-TOF ESI-MS/MS.

Видове тандем маспектрометри

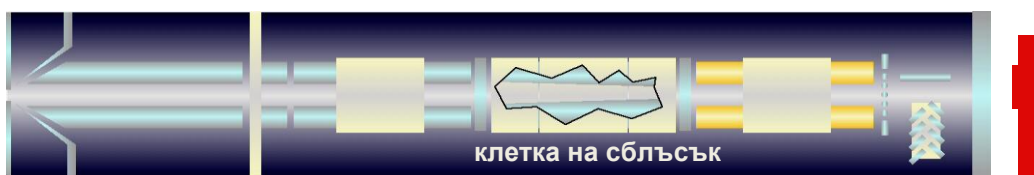
MALDI-TOF/TOF. Маспектрометрите с използващи метод на йонизация MALDI, съчетани с TOF- анализатор са намерили най-голямо приложение при анализ на протеини (с молекулно тегло 35 000-40 000) и пептиди. Те използват матрица - органична киселина, която е протонен донор. За анализ на протеини и пептиди често се използва α -циано-4-хидроксиканелена киселина, 2,5-дихидроксибензоена киселина, 3-метокси-4-хидроканелена киселина. Познати са различни видове маспектрометри, като Ultraflex MALDI-TOF/TOF (Brucker Daltonics, Germany), който работи в MS и MS/MS режим. Апаратът използва TOF техниките както за подбор на йоните в началото на измерването, така и за определяне на йонните в края. Отмерващият селектор (TIS) позволява на подбора на йони с определено m/z да бъде препратен от първия TOF анализатор към клетката за сблъсък. Всички останали йони се отстраняват. TIS е конструиран с две еластични врати, които могат да се отворят и затворят бързо. Врата 1 действа като филтър за малки маси, докато втора врата действа като филтър за големи маси. При определено време на преминаване на йоните през втора врата, се отклонява траекторията на йоните с по-големи маси от тази на избрания йон. Следователно, единствените йони, които влизат в клетката за сблъсък, трябва да минат през двете врати за краткия период от време между отварянето на първа врата и затварянето на втора и да достигнат до втория TOF-анализатор. Използвайки MALDI-TOF/TOF може да бъдат

секвенирани и определени АК последователност на протеините. MALDI-TOF/TOF се използва и при анализ на гликани.

Електроспрей-йонизационен маспектрометър (ESI-MS). Друг вид маспектрометър е електроспрей йонизационен маспектрометър. При електроспей-йонизационния маспектрометър пробата е разтворена в буфер и се впръсква под налягане в анализатора, преминава през различни сложни участъци от апарата и претърпява редица промени. След пулверизирането и йонизирането на пробата от наноспрей иглата и йоните минават през “проба-конуса”, лещите, Rf хексапол-фокусираща система и през първия квадруполен амализатор. С помощта на електроспрей-йонизационените маспектрометри могат да бъдат направени различни измервания, като:

- ✓ определяне на масата на биомолекулите в нативно или денатурирано състояние;
- ✓ фрагментиране на отделни молекули и анализиране на състава им;
- ✓ определяне и анализиране на гликани.

Квадруполни маспектрометри. Едни от най-често срещаните днес масанализатори в аналитичните лаборатории са квадруполните маспектрометри. Те включват не само стандартните анализатори, но и допълнително са свързани към различни хроматографски системи, като течен или газов хроматограф. Q-TRAP системата е много чувствителен инструмент и се използва за измерване и фрагментиране както на пептиди, така и на въглехидратни вериги. Той е изграден от три или четири анализатора, отбелязани на с Q 0-3 (Фиг.9).



Фиг. 9. Схема на Q-TRAP инструмент при който се комбинират течна хроматография с Q-TRAP, като пробата от HPLC системата директно се впръсква в маспектрометъра за анализ.

Този инструмент е подходящ за анализиране на структурата на пептидни и на въглехидратните вериги на гликопептиди. Анализирането на пробите започва в анализатор **Q0**, като се избира линеен режим (MS) на измерване, при който се определят масите на пептидите. Един от йоните, показан на MS спектъра се избира от **Q1**, за да бъде фрагментиран. Избраният пептид с определена маса преминава в следващия анализатор **Q2**, където е разположена клетката на

сблъсък. След това системата се включва в MS/MS режим и клетката на сблъсък се пълни с газ аргон, и неговите атоми фрагментират точно избрания йон (пептид). Получените йони след фрагментиране на избрания йон от MS спектъра преминават в анализатора **Q3**, след което се отправят към детектора, като се отчитат само фрагментираният йон от определения пептид. Те достигат по различно време до детектора, което се отразява на масспектър, от който определяме и аминокиселинната последователност на пептида.

Комбинираната Q-TRAP-LC/MS/MS системата има специално приложение, а именно за определяне центъра на свързване и фрагментиране на въглехидратни вериги в протеините. Q-TRAP-MS/MS системата дава възможност селективно да се анализират гликопептиди и гликани. От получените спектри се определят кои центрове на гликозилиране от пептида са заети, а също така и структурата на въглехидратните вериги. Получените спектри от Q-TRAP-MS/MS системата могат да се интерпретират както ръчно, което е трудно и неточно, така и чрез специални програми, като: Data Explorer, TextPad и Peaks Studio и др.

Synapt – High Definition MS (HDMS). SYNAPT- HDMS е най-новото поколение масспектрометри. Той е подходящ за определяне на структурата на протеини, за анализ на метаболитни процеси, изобарно структурно идентифициране и др. (Фиг. 11).

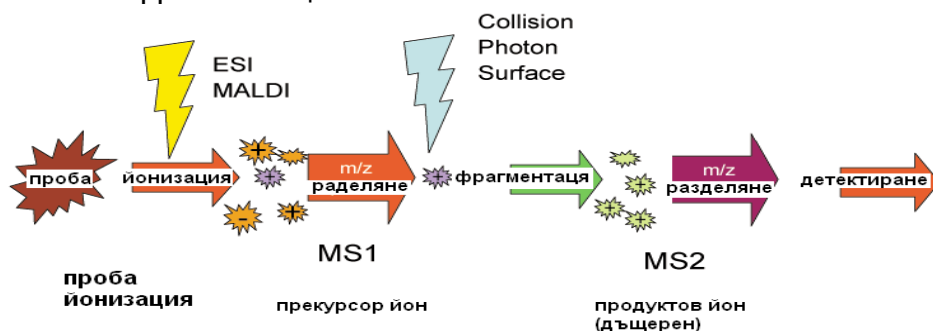


Фиг. 11. SYNAPT- HDMS и възможности за приложение

SYNAPT-HDMS дава възможност за диференциране на пробите не само по размер, форма и зареждане на частиците, но той предоставя уникалната възможност да бъдат направени измервания, които не са възможни по никакъв друг начин.

Основни принципи на анализа с тандем маспектрометрията – фрагментиране на йони

Тандем маспектрометрията (MS-MS) дава възможност да се получи информация относно структурата за дадено съединение, чрез фрагментиране на специфични йони на пробата вътре в маспектрометъра и идентификация на получените йони (Фиг. 12). Така информацията може да бъде сглобена подобно на пъзел, за да се получи информация относно структурата на цялата молекула. Тандем Маспектрометрията позволява също така, да бъдат отчетени специфични съединения в сложни комплексни смеси поради техните специфични и характеристични фрагментационни шаблони.



Фиг. 12. Схема на тандем маспектрометър с два анализатора разделени от клетка на сблъсък, атомите на инертен газ (например аргон или ксенон), се сблъскват с избрани йони от MS1-анализатор и настъпва тяхното фрагментиране, в резултат на CID.

Фрагментацията на молекулния йон, може да бъде предизвикана чрез дисоциация. Има няколко начина на дисоциация:

- Дисоциация инуцирана от сблъсък (CID) - високо енергетична или ниско енергетична;
- Дисоциация с улавяне на електрони ECD;
- Дисоциация чрез електронен трансфер ETD;
- Фотонна дисоциация (Inferred multi-photon dissociation (in a Trap) и др.

Продуктово или дъщерно йонно фрагментиране

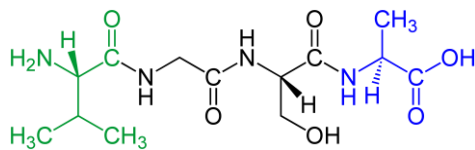
Първият анализатор се използва, за да се изберат йоните на пробата определени от потребителя идващи от определен компонент; обикновено молекулно свързани йони ($[M+H]^+$ или $[M-H]^-$). Тези йони преминават в "клетката на сблъскване", където биват бомбардирани от атомите на инертен газ, което предизвиква формирането на фрагментирани йони, които биват анализирани на втория анализатор според тяхното съотношение m/z (масово число). Всички фрагментирани йони, възникват директно от прекурсорните йони и по този начин

йоните образуват пръстов отпечатък, характерен само за съединението, което се изследва.

Този вид експерименти в известна степен са полезни за снабдяване с информация относно структурата на малки органични молекули и за набавяне на информация относно секвенцията на пептида.

Анализ на пептиди чрез тандем мас-спектрометрия

Молекулата на всеки пептид е изградена от 2 до 50 аминокиселинни остатъци свързани с пептидна връзка. Единия крайна пептидната верига съдържа с аминогрупа (NH_2), а другия карбоксилна група (COOH):

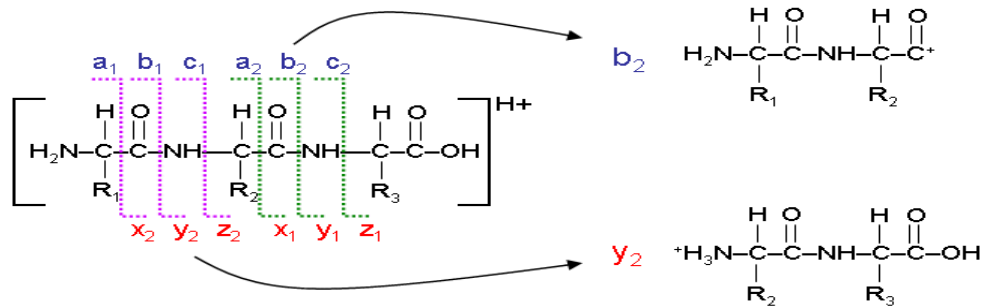


Най-разпространеното е продуктовото или дъщерно йонно сканиране, което е подходящо за определяне АК последователност на пептиди. АКП на пептиди, получена чрез тандем масспектрометрия може да бъде използвана за идентифицирането на протеини в базата данни.

Фрагментирането на пептиди обикновено протича по пептиден скелет. Фрагментацията на пептидният йон, може да бъде предизвикана чрез дисоциация инициирана от сблъсък (CID), трансфер на протони или чрез електронен трансфер.

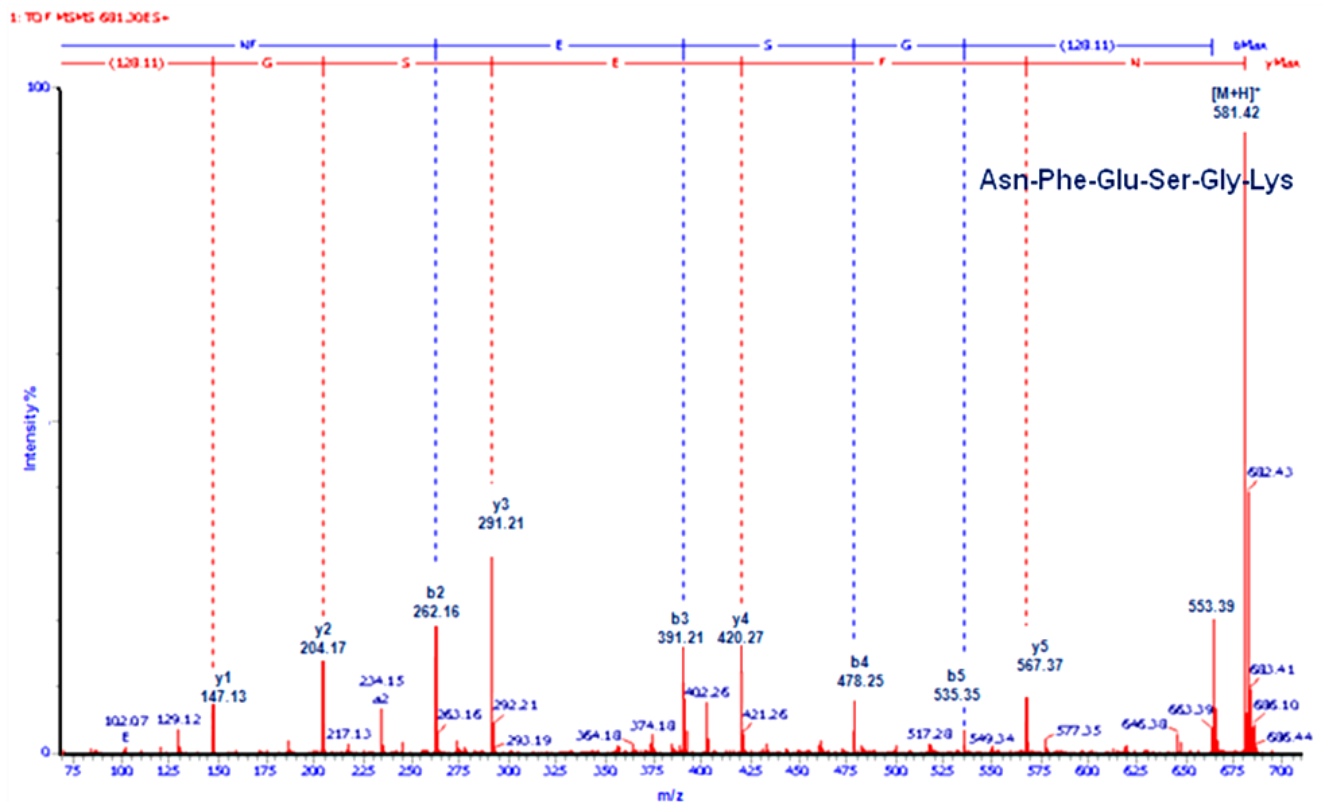
Фрагментирането на пептидите се базира на схемата на Репстоф и Фолман (1984) (Фиг. 14). Протонирани молекули на пептида се фрагментират по протежение на пептидният скелет, при което настъпва разкъсване на NH-CH , CH-CO и CO-NH връзките. Всяко късане на връзка дава два вида частици – една неутрална и друга заредена, като само втората се отчита от масспектрометъра. От тук има шест възможни фрагментни йони за всеки аминокиселинен остатък и се означават както в диаграмата по-долу с “a, b, c” йони, където имат заряд на N-крайния фрагмент и “x, y и z” йони, имащи заряд на C-крайния фрагмент. Най-честите места за разкъсване са CO-NH връзките, които водят до появата на “b” и/или “y” йони. Разликата между два съседни “ $b_2 - b_1$ ” или “ $y_2 - y_1$ ” йони е индикация за конкретен аминокиселинен остатък (Фиг. 14). Степента на фрагментирането на страничната верига, която е отчетена, зависи от вида на анализаторите, използвани в масспектрометъра. Апаратът с магнитен сектор-магнитен сектор, ще даде повишение до високо енергетични сблъсъци, което ще доведе до много различни видове разкъсвания в страничната верига. Квадрупол-квадрупол и

квадрупол-TOF Маспектрометрите, създават ниско енергетични фрагментации, с по-малко видове фрагментация в страничната верига.



Фиг. 14. Пептидно секвениране, чрез тандем маспектрометрия.

Пример на MS/MS продукти или дъщерен йон спектър илюстрирана Фиг.15.



Фиг.15. Определяне на АК Пна пептид чрез тандем маспектрометри.

Доминиращите йони в MS спектъра са протонирани молекулни йони $[M+H]^+$ при m/z 681.4, от където е определена молекулната маса на пептида – 680.4Da. Тези йони се подават на първия анализатор, после се фрагментирани в “клетката на сблъсък” и получените продуктови йони се анализират от втория анализатор, при кето се получава следващия MS/MS спектър. В този пример пептида е фрагментиран чрез разкъсване преимуществено на CO-NH връзките, което дава и двата – b и y йони. От спектъра е определена АК последователност

на пептида– NFESGK (Фиг. 15). Имониевите йони при m/z 102.07 потвърждават присъствието на глутамин в пептида.

Анализ на протеини чрез масспектрометрия

Протеините представляват линейни полимери, изградени от 20 различни L- α -аминокиселини, 19 от които без глицина са оптично активни и са свързани помежду си чрез пептидни връзки. Краят на протеина със свободна карбоксилна група е познат като С-краен или карбоксилен край, докато краят със свободна аминна група е познат като N-краен или аминен край.

Значението на белтъците произтича от разнообразните им и жизнено важни функции, които те изпълняват в организма (структуро-образуваща, каталитична, защитна, регулаторна, транспортна, двигателна, рецепторно-сигнална и др).

Протеините имат четири нива на структурна организация, което е важно при определяне на молекулните маси на протеините и при протеомния анализ.

Масспектрометрични подходи при идентифицирането на протеини:

- I. Top-down (отгоре надолу): непромененият, цял протеин се йонизира и се анализира масата му;
- II. Bottom-up: нативният протеинът се разгражда ензимно до пептиди.
- III. Peptide-mass fingerprinting: идентифициране на протеина по характерното подреждане на пептидите по маса, след протолитична хидролиза;
- IV. de-novo sequencing: определяне на протеина, чрез идентифициране на АКП на пептидите, получени чрез тандем масспектрометрия.

След многоетапно пречистване чрез хроматография, изходният протеин се подлага на протолитична хидролиза. По този начин се получават няколко пептидни фрагменти, които могат да бъдат разделени чрез хроматография и пречистени (най-често) с помощта на високоефективна течна хроматография (HPLC). Следва анализ на фракциите чрез тандем масспектрометрия, най-често се използва LC–ESI-MS или MALDI-TOF-TOF. Внимателно се анализират всички получени секвенции и се търсят местата на припокриване на отделните секвенирани пептиди, като по този начин се получава по-пълна информация за изходния протеин. Посредством програми се прави налагане на определената АКП на изследвания протеин и съществуващата база данни

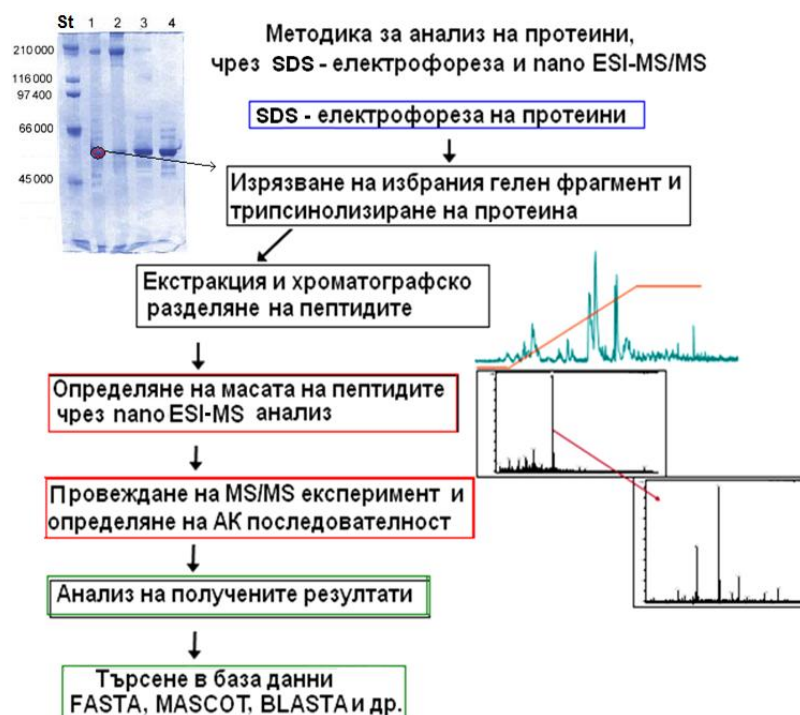
Редица протолитични ензими се използват за разкъсването на поипептидния скелет, като всеки ензим може да къса полипептидната верига при точно определен аминокиселинен остатък (Таб. 2). Специфичността на ензимите е

важна, от тях зависи броят и размерите на полипептидите, които се получават. Ако са прекалено специфични, то ще се получат малък брой полипептиди, с голяма молекулна маса, което ще създаде трудност при интерпретирането на получените секвенции. Ако ензимът, който използваме е твърде неспецифичен, ще се получат голям брой нискомолекулни пептиди, които ще бъдат интерпретирани лесно, но ще бъде трудно да бъдат наложени, за да се получи пълната аминокиселинна последователност на изходния протеин. Информация за аминокиселинната последователност на изходния протеин, напр. броя на някои определени аминокиселини ще е от полза, за да бъде предвиден броя на полипептидите, които ще се получат вследствие на ензимното действие.

Таблица 2. Ензими, използвани за протеолиза на полипептидната верига на протеини с цел определяне на АК последователност.

Ензим	Място на късане
Трипсин	Карбокси края на лизин (освен, когато е свързан пролин) и аргинин
Химотрипсин	Карбокси края на фенилаланин, триптофан и тирамин
Пепсин	Амино края на фенилаланин, триптофан и тирамин
Ендопротеиназа Лизин-С	Карбокси края на лизин, освен когато е свързан с пролин

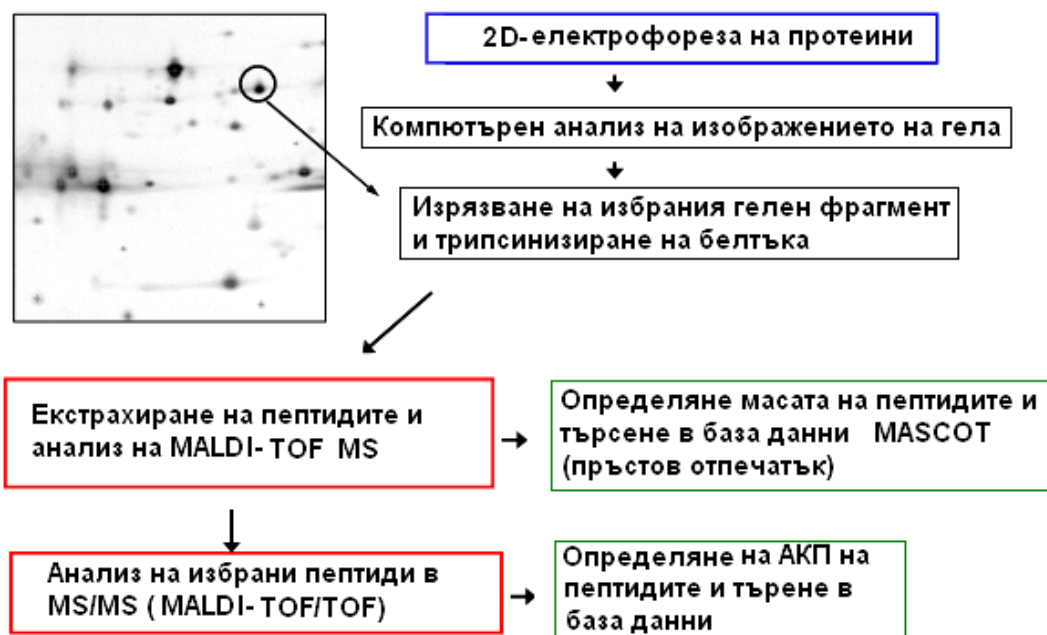
Идентификация на протеините може се извърши по-бързо, чрез прилагане SDS-електрофореза (Фиг. 16) или двуизмерна електрофореза (Фиг. 17), последвано от хидролиза специфична протеаза, най-често трипсин.



Фиг. 16. Работна методика, използваща денатурираща SDS-електрофореза и ESI-MS/MS за идентифициране на изследвания протеин.

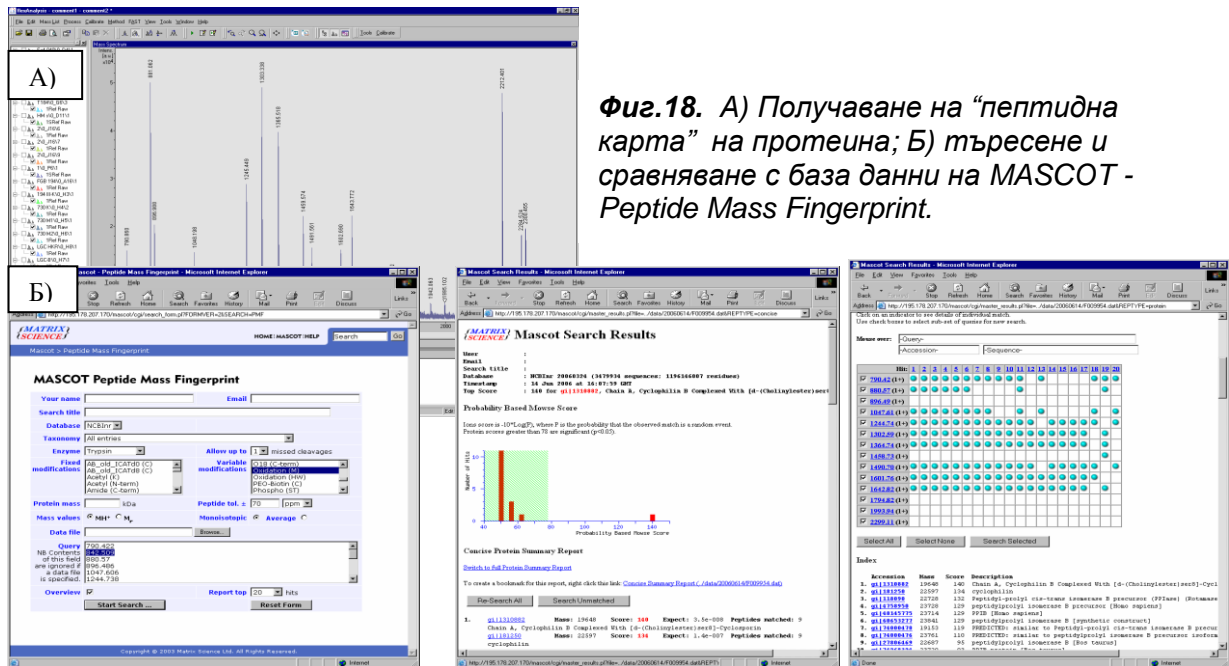
Получените пептиди се екстрахират и могат веднага да се анализират маспектрометрично чрез тандем маспектрометрия (Фиг. 17). Първо се провежда MS-анализ на фрагментите на протеина. Така полученият спектър, с неговата информация за молекулните маси на фрагментите, се нарича “пептидна карта” на протеина. Ако АК последователност на този протеин или на подобни протеини вече е включена в база данни, то в такъв случай пептидната карта е достатъчна, за да се определи вида на изследвания протеин.

Методика за анализ на протеини,
чрез 2D - електрофореза и MALDI-TOF/TOF



Фиг. 17. Най-използваната работна методика за определяне на първичната структура на протеина, чрез *Peptide-mass fingerprinting* или *de-novo sequencing*. Тази стратегия, включваща 2-Д електрофореза се използва успешно при протеомния анализ.

Получените данни от MS-анализа на фрагментите на протеина се вкарват в Mascot Peptide Mass Fingerprint. Избира желаната база данни, като се посочва вида на организма (или търсене във всички известни геноми), посочва се протолитичния ензим и точността, с която е извършено измерването на молекулно тегло. След минути, излизатат резултатите от система на база данни на Mascot, за по-подробни резултати се избира “Protein Summary Report”. Този процес, известен като «пептидно картиране» изисква употребата на компютър и специален софтуер. Основният MS спектър, представящ молекулните маси на всички компоненти в сместта, често може да даде достатъчно информация, за да се претърси базата данни, използвайки само някои от молекулните тегла от тази пептидна “карта”.



Фиг.18. А) Получаване на “пептидна карта” на протеина; Б) търсене и сравняване с база данни на MASCOT - Peptide Mass Fingerprint.

В повечето случаи анализираните протеини не са регистрирани в база данни, тъй като имат непознати структури. В този случай определянето на масата на пептидите не е достатъчно за идентифицирането на протеина, за това пептиди се анализират с тандем-маспектрометрия.

Извършва се *de novo* секвениране, което разкрива структурна информация за протеина, чрез фрагментиране на непокътнати пептиди в рамките на маспектрометъра. Всеки MS-идентифициран компонент от протолитичната смес, се анализира в MS/MS режим с цел определяне на АКП. От всеки един спектър се получава различна информация за АК последователност. Внимателно се анализират всички получени АКП и се търсят местата на припокриване на отделните пептиди. По този начин се получава по-пълна информация за изходния протеин. Получената информация се сравнява с подадената информация за други протеини в база данни чрез програмите BLASTA, FASTA или MASCOT. При установяване на висока хомоложност между АК последователности, може да се определи какъв вид е анализирания протеин. *De novo* секвенирането се използва за идентификация на неизвестни протеини и при протеомен анализ.

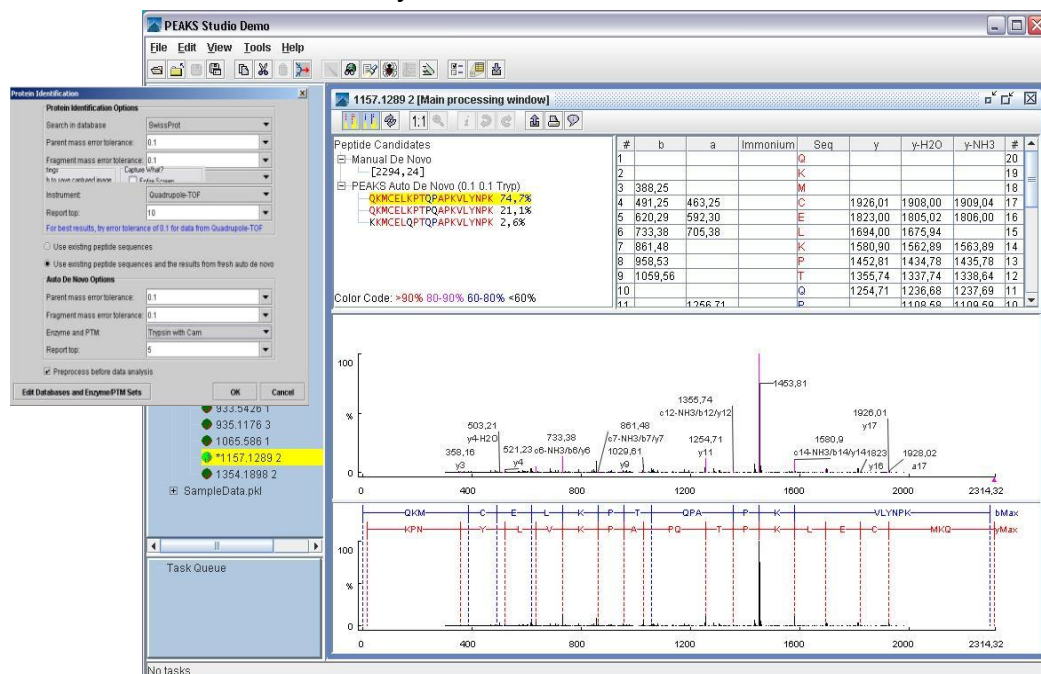
Интерпретиране на MS/MS анализите чрез маспектрометричен софтуер *Peaks Studio*

Peaks Studio- представлява маспектрометричен софтуер, създаден в помощ на изследователите, занимаващи се с протеомика за интерпретиране на MS/MS анализите на фрагментираните пептиди. *Peaks Studio* използва най-бързия

и най-точния алгоритъм за автоматично “de novo” фрагментиране на пазара в момента. *Peaks Studio* е иновативен софтуер, чрез който се получават АК последователности и се идентифицират протеини, получени от маспектрометрични анализи. След провеждане на MS/MS анализа на протеина, чрез този софтуер се прави “de novo” фрагментиране на пробата и последващо търсене в базата данни за идентифициране на протеините и пептидите, използвайки данните от маспектрометричния анализ.

Програмата осигурява лесен и бърз начин за анализиране на получените MS/MS спектри, както автоматично, така и ръчно, което позволява на изследвателя да въведе конкретни, интересувачи го параметри и да получи няколко варианта за АК последователност на един пептид. Независимо дали се изследват известни или неизвестни протеини или пептиди, този софтуер дава винаги оптималните резултати.

На Фиг. 36 е представена програмата *Peaks Studio*. Въвеждат се параметрите, при които е протекъл анализа, като вида на използвания маспектрометър, вида на йонизация, ензимът с който е третиран протеина и др. Чрез тази програма е определена пълната АК последователност на пептид с маса 1157.1289, както и стойностите на у и в йоните.



Фиг. 18. Работа с програмата *Peaks Studio* А)Настройки; Б) Резултат, който се получава при “de novo” фрагментиране на пептид с маса 1157.1289. Данни от програмата *Peaks Studio*

За по-прецизно фрагментиране на протеините с програмата, софтуерът позволява и въвеждане на различни пост-транслационни модификации, за които

предполагаме, че протеинът би могъл да претърпи. Част от обработката на информацията може да бъде автоматизирана, но за създаване на точна и надеждна информация, интерпретацията и обработката на спектрите трябва да се провери и ръчно, което отнема повече време, отколкото събирането на данните.

При неанализирани протеини, “de novo” фрагментирането, автоматично или ръчно, е единственият метод за идентифицирането им, тъй като нито една база данни не съдържа тези резултати.

Масспектрометрия и протеомика

Пълният набор протеини в клетката се нарича “*протеом*”, а изследване на структурата и функцията им се нарича “*протеомика*”, т.е. протеомиката е наука за изучаване на протеома. Протеомът се променя непрекъснато в отговор на десетки хиляди фактори на околната среда и извънклетъчни сигнали. Той варира в зависимост от състоянието на организма (здрав или болен), от естеството на всяка тъкан, от етапа на развитие на клетката, както и от въздействието на лекарства.

Протеомиката се смята като следваща стъпка, при изучаване на биологичните системи, след геномиката. Марк Уилкинс дефинира протеомиката като „учение за протеините, начина по който те се модифицират, времето и мястото на тяхната експресия, участието им в метаболитните пътища и взаимодействието по между им”.

Основен предмет на протеомиката е, изследването на протеините и взаимодействието им в живите организми, в частност техните структури и функции. Казано накратко, протеомиката е наука, която анализира структурата и функцията на биологичните системи - изучава получаването на протеините, тяхното разграждане, белтъчния обмен и всички модификации, които те претърпяват в даден организъм, в резултат на болест, стрес, или друг фактор, от които зависят. Целта на протеомиката е да анализира протеома на организмите и да следи динамиката в него.

Основните задачи на протеомиката са:

- изготвянето на протеинови карти на клетката;
- анализа на експресията на протеините в клетката;
- изучаването на взаимодействията между протеините

Задачи на масспектрометрията в протеомиката:

- Анализ на смеси от пептиди и белтъци;

- Определяне на аминокиселинната последователност (АКП) на протеини и пептиди;
- Идентификация на изоформи на протеини и охарактеризиране на сложни протеинови комплекси и определяне на тяхната функция;
- Търсенето на биомаркери.

В резултат на дългогодишни протеомни изследвания е създадена обширна база данни от идентифицирани и охарактеризирани протеини, открити в телесни течности, в тъкани при някои заболявания и след различни терапии. Този каталог продължава да нараства и да се обновява, което спомага за пълното идентифициране и охарактеризиране на протеините. Базата данни за пълния човешки протеом, за протеиновите секвенции и функционална информация е достъпна безплатно на интернет адрес <http://www.uniprot.org>.

Обикновено биологичната проба съдържа множество протеини в различни концентрации. Първите стъпки при обработката на дадената биологична проба включват процеси, които се провеждат за частично пречистване на протеините (хомогенизиране, ултрацентрифугиране, промиване и премахване на липиди). Самият протеомен анализ обхваща последните три стъпки от представената схема на Фиг.19.

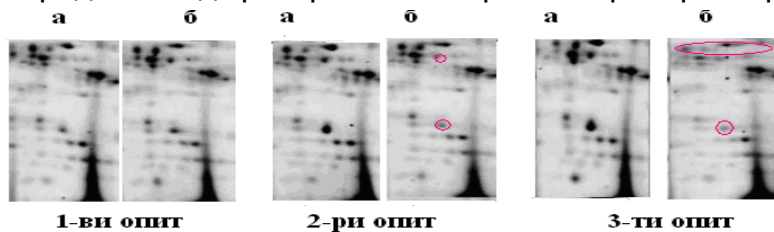


Фиг. 19. Основни стъпки за провеждане на протеомен анализ.

2Д-ПАГЕ е класически метод, който се използва в протеомиката за разделяне и визуализиране на сложни протеинови смеси. Чрез него се разделят разтворими протеини с изоелектрични точки между рI 3 и 10 и молекулни маси от 10 до 130 кДа. Получените протеиновите петна могат да бъдат изрязани от гела и идентифицирани чрез маспектрометричен анализ. Ето защо, приложението на маспектрометрията за определяне на масите и аминокиселинната последователност на протеини и пептиди, представлява ядрото на протеомиката.

Обикновено около 200 до 500 протеина могат да бъдат изрязани, анализирани и идентифицирани от 2Д-ПАГЕ електрофорезата със сребърно оцветяване или друг метод на бояване (напр. флуоресцентно).

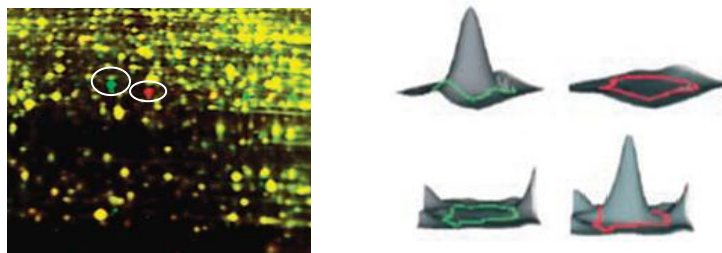
На фиг. 20 са показани 6 гела, които отразяват промяната на протеините в клетката преди и след третиране с лекарствен препарат в различни количества.



Фиг. 20. Промяната на протеиновата карта в туморна клетка преди и след третиране с лекарствен препарат в различни количества: 50 μл/мл; 200 μл /мл и 500 μл/мл.

При третиране на туморните клетки с ниска концентрация на препарата не се наблюдава промяна в протеиновата карта (първият опит), но при повишаване на дозата се наблюдават съществени промени, както е показано в опит две и три.

При този метод е трудно да се определи с точност промяната на позицията и интензитета на петната. Ето защо най-съвременният метод е изграден на базата на предварително маркиране на двете проби с различни флуоресциращи маркери и при провеждане на 2Д-електрофорезата и анализирание на флуоресциращ скенер, много ясно се разграничават отместванията и промените настъпили в протеинната карта (Фиг. 21).



Фиг. 21. 2Д-електрофореза на две проби, маркирани с различни флуоресциращи маркери.

Получените “карти” на протеините могат да се сравняват помежду си и така да се открият разликите между пациенти със специфично заболяване и контролите на здрави пациенти. Това позволява откриването на различно експресирани протеини, които могат да бъдат свързани с патогенезата на изучаваната болест.

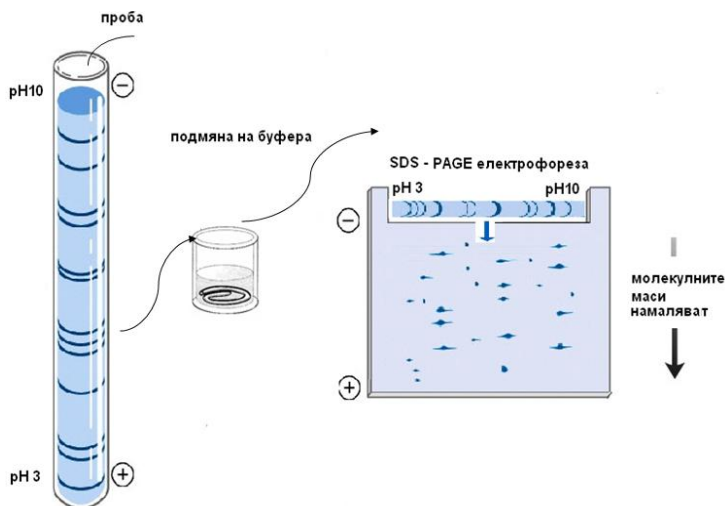
Същност на двумерен полиакриламиден гел

Двумерен полиакриламиден гел електрофореза разделя протеините според:

- 1) техният заряд (изоелектрична точка - pI), чрез изоелектрично фокусиране;
- 2) размер (молекулна маса) - чрез денатурираща полиакриламидна електрофореза.

Двудименсионална електрофореза е метод, подходящ за разделяне на сложни протеинови смеси, което позволява анализ на стотици продукти. Това е почувствителен аналитичен метод, от всеки самостоятелен електрофоретичен метод. Двудименсионалната електрофореза отделя протеините с подобно молекулно тегло, но се различават по pI , или протеини с еднакви pI - стойности, но с различно молекулно тегло.

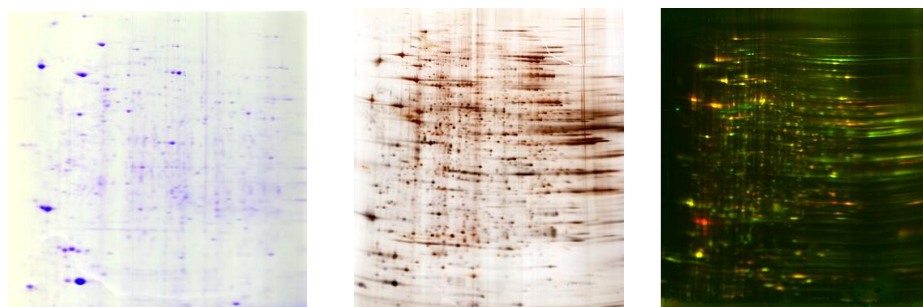
Двудименсионалната електрофореза започва с изоелектрично фокусиране, при което протеините се разделят в зависимост от изоелектричната им точка (ИЕФ) (Фиг. 22). За целта се използва pH градиент (стабилният pH градиент се установява в гела при добавяне на подходящи амфолити) и се прилага се електрически потенциал, като по този начин единият край на гела е положително зареден, а другият е отрицателно зареден (Фиг. 22). При прилагане на електрично поле протеините навлизат в гела и се движат, докато всеки от тях достигне до стойност на pH , съответстваща на неговата pI , когато $pH = pI$, електричният заряд на протеина е нула. При всички стойности на pH различни от изоелектричната точка, протеина ще бъде зареден. Ако протеините са положително заредени, те ще се придвижат към по-отрицателно заредения край на гела, а ако са отрицателно заредени, ще се придвижат към по-положително заредения му край. Изоелектричното фокусиране е процедура, която се използва за установяване на изоелектричната точка (pI) на протеина. ИЕФ може да разделя протеини, които се различават по pI с по-малко от 0.01, т.е. един електричен заряд. След завършването на разделянето на протеините в първото направление, се прилага денатурираща SDS полиакриламидна гел-електрофореза, като второ направление, където протеините, се разделят според техните молекулни маси. Преди разделянето по маси, стрипа се третира с буфер с натриев додецил сулфат (SDS), както и с други реагенти, характерни за полиакриламидната гел-електрофореза. SDS е най- използваният детергент при електрофоретичния метод за определяне на чистотата и молекулното тегло на протеините, който разкъсва почти всички нековалентни взаимодействия в структурата на протеините и елиминира различията, възникващи поради заряд и структура.



Фиг. 22. Двудименсионална полиакриламидна гел електрофореза 2Д-ПАГЕ.

При второто направление се използва електрически потенциал под ъгъл от 90 градуса спрямо първото направление. Отрицателно заредените протеини се привличат от по-положително заредения край на гела, пропорционално на отношението им маса/заряд. В резултат, протеините се разделят по маса и се разпределят по целия гел (Фиг. 22).

Резултатите от двудименсионална електрофореза могат да бъдат визуализирани по различен начин, но най-често се използва сребърно оцветяване или оцветяване с Coomassie Brilliant Blue (Фиг. 23 а). При сребърното оцветяване (Фиг. 23 б), среброто се свързва с цистеиновите групи на протеина. То потъмнява при излагане на ултравиолетова светлина. Потъмняването на среброто може да се отнесе към количеството сребро и количеството протеин на определеното място в гела. По този начин може да се получи само приблизителна информация за количеството протеин, но в повечето случаи тази информация е задоволителна.



Фиг. 23. Оцветяване на 2Д-ПАГЕ електрофореза: а) Coomassie Brilliant Blue ~ 50 ng/петно; б) сребърен нитрат ~1 ng/петно; в) Флуоресцентно маркиране ~ 0.5 ng/петно.

Молекулите на полипептиди могат също да се разделят чрез 2Д-ПАГЕ електрофореза. След завършване на електрофорезата, полипептидите се оцветяват Coomassie Brilliant Blue или със сребърен нитрат, или се детектират с флуоресценция (Фиг. 23в) или авторадиография. Друга възможност е, протеините

да се прехвърлят върху имобилизирана мембрана и да бъдат открити с помощта на специфични реагенти като антитела.

Гликозилиране на протеините

Гликозилирането на протеини представлява, ковалентно свързване на въглехидратни структури (още наричани захари, олигозахариди или гликани) към полипептидните вериги. Гликаните обикновено съставляват 1-30% от общото тегло на молекулата, макар че, някои гликопротеини имат и по-виоко въглехидратно съдържание - 50-60%. Олигозахаридните структури са предимно разклонени, но рядко съдържат повече от 15 монозахаридни остатъци. Въглехидратните вериги са изградени предимно от хексози: маноза, галактоза, N-ацетилхексоамин.

Изключително голямото разнообразие на гликопротеините е свързано както с биосинтезата на изграждащите ги полипептидни вериги, така също и с посттранслационното модифициране – гликозилиране. Гликозилирането е най-разпространената и посттранслационна модификация при протеините.

Гликозилирането на протеините играе важна роля в много биологични процеси, като клетъчното разпознаване, растеж, диференциация и клетъчна смърт. Доказано е, че специфичните промени в гликозилирането са от ключово значение за прогресията на заболяванията и може да има диагностична стойност при различни видове болести, като рак, възпалителни процеси, автоимунни заболявания и др.

Детайлното познаване на гликозилирането на протеините в протеомен мащаб, се превръща във важен аспект на пост-геномните изследвания. Гликомиката има за цел да идентифицира структурата на молекулата на гликопротеините и да изследва функцията и връзката им с други клетки и молекули в тялото. Установяването на структурата на гликопротеините и по-задълбоченото познаване на функцията им, прави възможно разработването на процедури и терапии, които подобряват здравето и удължават живота на хората.

Класификация на гликопротеините

Гликопротеините са класифицирани по два основни критерия:

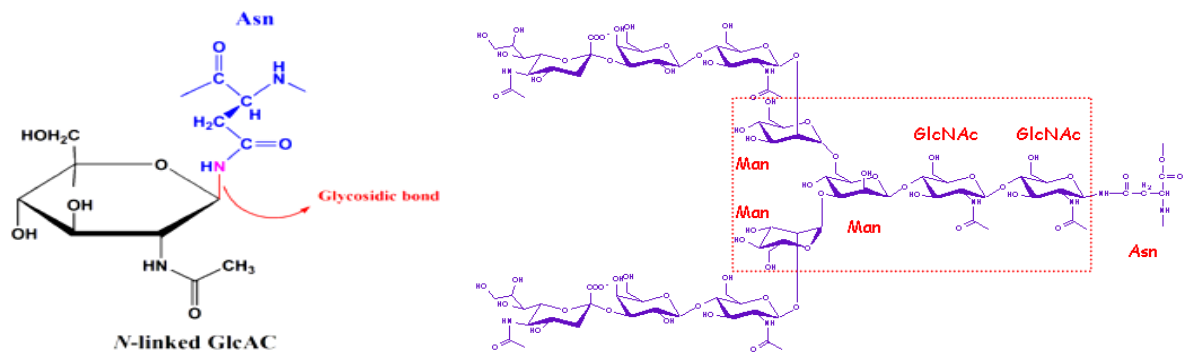
- 1) по отношение на природата на гликозидната им връзка и
- 2) по отношение на биологичната им активност.

В зависимост от първия критерий те са разделени на три основни класа, в зависимост от природата на гликозидната връзка, а именно:

- ✓ N- свързани гликопротеини – гликановата структура се свързва с аминокгрупата на аспарагиновия остатък, включен в строга последователност (Asn-X-Ser/Thr) в ендоплазмения ретикулум;
- ✓ O- свързани гликопротеини – гликозидната връзка се осъществява между монозахаридния остатък и хидроксилната група на серина или треонина в апарата на Голджи и цитозола;
- ✓ C- свързани гликопротеини - манозата свързва C2 от индоловото ядро на триптофана от аминокиселинната последователност Trp-X-X-Trp [de Beer T., et al., 1995]

Най-разпространените видове гликозилиране са N- и O- свързани гликопротеини, каквито се наблюдават и при хемоцианините.

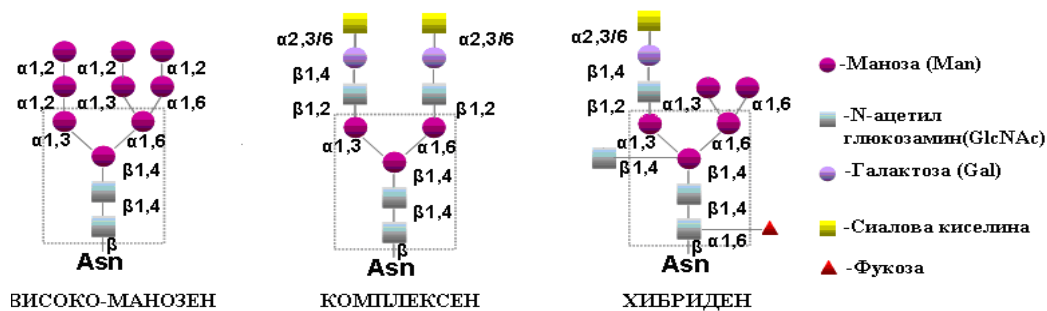
Първият клас гликопротеини са N-гликозилирани, където крайният N-ацетилглюкозамин от олигозахаридната верига е ковалентно свързан към amidния азот на аспарагиновия остатък (Asn) от полипептидната верига, намиращ се в строга последователност (Asn-X-Ser/Thr), където X може да бъде всяка аминокиселина с изключение на пролин (Фиг. 24). Общото при тези гликанови структури е пентазахаридния гръбнак (сърцевина), изграден от два N-ацетилгалактозамини и три манози (Фиг. 24).



Фиг. 24. А) N- Гликозидна връзка; Б) Детайлна структура на въглехидратна верига на N-гликан, като пентазахаридната сърцевина е оградена.

В зависимост от структурата на въглехидратните вериги, свързани към пентазахаридната сърцевина, N-гликаните се разделят на три типа: високо манозни, хибридни и комплексен тип N-гликани (Фиг. 25).

Гликаните от високо манозния тип предимно съдържат манозни остатъци, свързани към ядрото. В по-висшите еукариотни организми се срещат гликани, съдържащи от два до шест допълнителни манозни остатъци, докато при по-нисшите еукариоти, този брой може да е доста по-висок.



Фиг. 25. Основни структури при N-свързани гликопротеини.

Гликаните от комплексен тип са най-разпространения клас при бозайниците и не съдържат допълнителни манозни остатъци. N-ацетилглюкозаминовите остатъци (GlcNAc) са свързани към външните манозни остатъци от структурата на ядрото. Те могат да бъдат свързани с галактози (Gal), N-ацетиллактозамини (GalNAc) и сиалова киселина, или алтернативно с GalNAc и сулфатни групи. Характерната пентазахаридна сърцевина, често е модифицирана, чрез фукоза (Fuc) свързана към крайния GlcNAc (свързан директно към аспаргина).

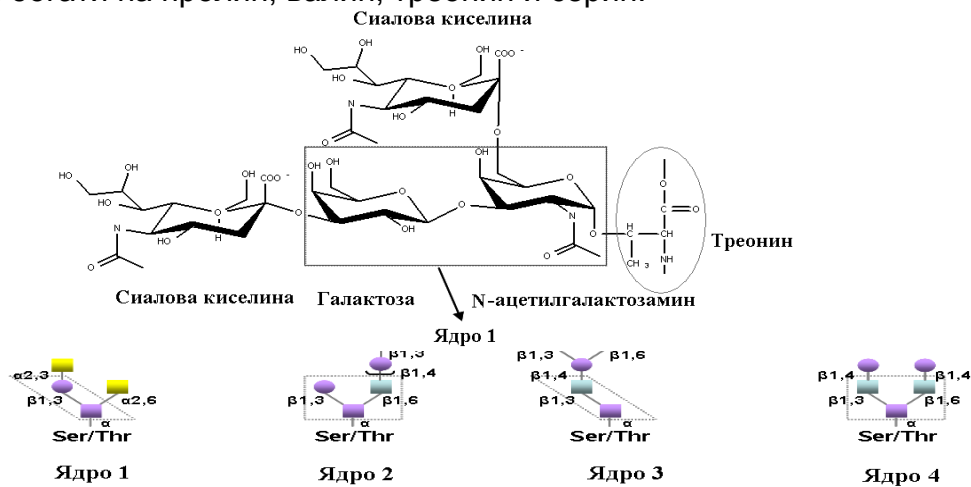
Третият тип N-гликани (хибридният тип), съдържа елементи и от високо манозен и от комплексен тип гликани. Хибридните структури често имат бисектна GlcNAc и Fuc, свързани към GlcNAc от пентазахаридната сърцевина.

При по-сложните въглехидратни структури, монозахаридните остатъци Gal и Man са свързани към Fuc и образуват сложни странични вериги, които имат съществена роля за имунологичните свойства на някои протеини. В зависимост от разклоненията на страничните вериги, най-често срещани са двуантенни и триантенни структури. В някои случаи към веригите са прикачени и метилни групи или по-рядко срещани сулфатни групи.

Вторият клас гликопротеини съдържат O-свързани гликани, при които GalNAc остатък на въглехидратната верига е ковалентно свързан към крайния кислород от треонининов (Thr) или серинов (Ser) остатък от полипептидната верига (Фиг. 26). Като алтернативни акцептори могат да бъдат хидроксипролина, хидроксилизина и тирозина.

Най-разпространеният вид O-свързани гликани съдържа първоначален монозахариден остатък - GalNAc. Тези гликани са известни като гликани от муцинов тип, поради широкото им разпространение в муцините. Освен т.н. муцинов-тип гликозилиране, съществуват и други видове O-гликозилиране, при които фукоза, маноза, глюкоза или ксилоза са директно свързани към Ser/Thr остатъци. Обаче, за разлика от N-гликозилирането, тук няма строга последователност в свързването на GalNAc към серина или треонина.

Центровете на O-гликозилиране често се срещат в участъци на полипептидната верига богати на пролин, валин, треонин и серин.



Фиг. 26. O-свързан гликан, съдържащ крайна N-ацетилнеураминова (сиалова) киселина, свързана към крайния GalNA. Въгледридни структури на O-гликани, прикрепени към серинов или треонинов остатък от полипептидната верига и представяне на сърцевината на четирите най-често срещани структури, която е оградена в правоъгълник.

Въгледридните структури на гликопептидите могат да бъдат изключително разнообразни, но основните монозахариди, които участват в изграждането им са: глюкоза (Glc), галактоза (Gal), маноза (Man), фукоза (Fuc), N-ацетилнеураминова киселина (NANA) (сиалова киселина), N-ацетилгалактозамин (GalNAc) и N-ацетилглюкозамин (GlcNAc). За разлика от протеините и нуклеиновите киселини, които са линейни полимери и образуват само един вид свързване, кодирано в генома, то монозахаридните остатъци изграждащи олигозахаридните вериги могат да са свързани както на различни позиции, даващи началото на разклонени структури, така и по различен начин (α - и/или β -свързване). Ето защо, са възможни огромен брой изомерни въгледридни структури. За щастие, в природата техния брой е ограничен, тъй като гликаните се образуват, в резултат на последователното действие на ензимите глюкозилтрансфераза и гликозидаза, които са генно кодирани за всеки организъм. Понеже гликозилирането зависи от експресията на тези ензимите, то и синтеза на въгледридните вериги зависи от вида и физиологичния статус на клетката, която експресира гликопротеина.

Масспектрометрията - ключова роля в анализа на гликопротеини и гликани

Масспектрометричните техники играят ключова роля в анализа на гликопротеини на гликопептидно ниво. Основните въпроси при определянето на въгледридната структура структурата са: 1) идентифициране на гликаните

структури, 2) определяне на центровете на гликозилиране и 3) гликановото профилиране на отделните центрове на свързване.

Структурата на гликопротеините и гликопептидите се състои от пептидна верига, свързана с един или повече въглехидратни остатъци, което може да е по-малко от 1% и да достигне до и над 50% от общата протеинова маса. Гликопротеините обикновено са високо хетерогенни, т.е. те са под формата на сложни смеси от различни гликоформи [Rudd P., Dwek R., 1997; Rudd P., et al., 1999; Dell A., Morris H., 2001]. Сложността на въглехидратните структури и техните производни налага използването на по-чувствителни и по-селективни методи за тяхното разделяне и анализ. Прилагат се комбинации от различни техники и аналитични методи, като класическите хроматография и електрофореза съчетани с модерна маспектрометрия, за охарактеризиране на гликани и гликопротеини [Dell A., Morris H., 2001; Zaia J., 2004].

При охарактеризиране на гликопротеини най-често се използват различни маспектрометрични техники и методи, като:

1. Електроспрей йонизация (ESI) и лазерно-десорбционна йонизация с помощта на матрица (MALDI). При използване на MALDI, по-добро структурно определяне на олигозахариди се постига в линеен режим на време на полет (TOF), отколкото в рефлекторен режим. Гликаните могат да бъдат анализирани чрез MALDI-TOF-MS (MS), за да бъде получена допълнителна информация за структурата и чистота.
2. Тандем-маспектрометрия - бърз и чувствителен анализ на гликопептиди, изолирани от гликопротеини след ензимна хидролиза с трипсин.
3. Най-често прилаганата комбинация от високо ефективната течна хроматография с тандем-маспектрометрия и електроспрей йонизация (HPLC-ESI-MS/MS) за изследване и определяне на структурите на гликозилираните съединения, въз основа на получени фрагментни и диагностични йони.
4. Анализ на маркирани гликани с 3-аминопиразол (3-AP), 2-аминобензоена киселина (2-AA) и др., с течна хроматография с хидрофилно взаимодействие с флуоресцентно откриване (HILIC-FLD колони за HPLC гликанов анализ) и тандем маспектрометрия с електроспрей йонизация (ESI-MS/MS).
5. Хроматографски профили на гликани с високо скоростна анионно обменна хроматография, комбинирана с метод на пулсово-амперометрично откриване (HPAEC-PAD)

6. Многоетапна тандем маспектрометрия – дава възможност за по-сигурна и надеждна идентификация на гликопротеините и определяне центровете на гликозилиране.

Тандем маспектрометрия – анализ на гликопротеини на гликопептидно ниво

Тандем маспектрометрията на гликопептиди е позната като един от най-важните инструменти в областта на структурната гликомика. Различни тандем MS/MS техники могат да бъдат приложени за анализ на гликопептиди като MALDI, MALDI-TOF/TOF-MS или MALDI-Q-TOF. Фрагментирането на йонизираните молекули на гликопептиди и гликани се постига главно чрез: 1) дисоциация индуцирана от сблъсък; 2) дисоциация вследствие на пренос на електрони.

Дисоциация индуцирана от сблъсък (CID) при гликопептиди. Първите проведени експерименти с маспектрометри с тройни квадруполи, използващи електроспрей йонизация (ESI) и дисоциация индуцирана от сблъсък (CID), са установили някои от основните характеристики на гликопептидите. Въз основа на тази пионерска работа, ESI с CID на гликопептидите се е превърнала в ключов инструмент в гликомиката.

Дисоциация чрез пренос на електрон (ETD) при гликопептиди. Фрагментирането на пептидните йони се осъществява чрез реакции с пренос на електрон в газова фаза от единично заредени аниони до протонираните пептиди. Единично заредените аниони се използват, за да осъществят пренос на електрони до протонираните пептиди. Подобно на ECD, дисоциацията вследствие на пренос на електрон води предимно до фрагментиране на скелета на пептидната верига в C и Z-тип йони. Ето защо, този начин на фрагментиране е много подходящ за анализ на пост-транслационна модификации, като фосфорилирането и гликозилирането. Това прави тази техника ETD, заедно с CID и ECD, много атрактивен инструмент за локализация на пост-транслационни модификации на пептидната верига.

CID предоставя информация относно състава на гликана, прикрепена към пептидния скелет, а ETD дава възможност за *де ново* секвениране на пептидите, тъй като тази фрагментация засяга предимно пептиден скелет и запазва посттранслационни модификации. Въглехидратните вериги свързани с пептидния скелет до голяма степен остават незасегнати от ETD процеса. Следователно, ETD позволява не само идентификация на

аминокиселинната последователност на гликопептид, но също така и недвусмислено определяне на центъра на гликозилиране.

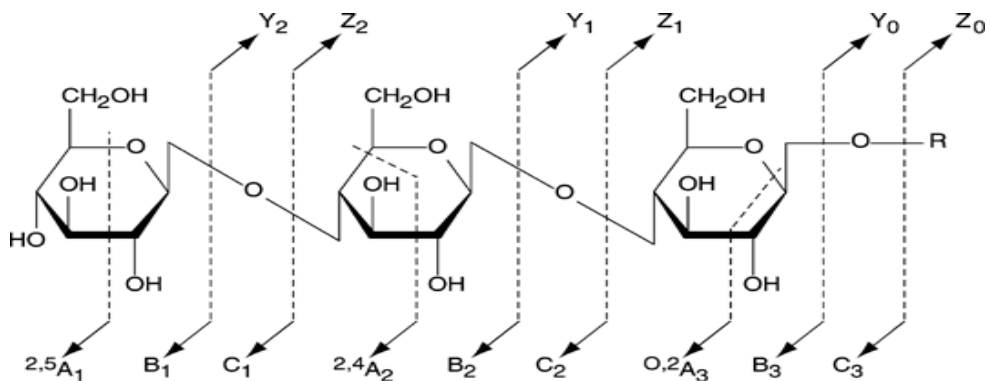
Обединяване на данните, получени от двете техники на фрагментация прави възможно изчерпателно да се охарактеризира целия гликопептид. Това е постигнато при използването на инструмент, с възможност за последователни CID и ETD експерименти. Установено е, че нано-ESI с квадруполен-TOF мас анализатор е чувствителен инструмент, който може да бъде използван за характеризиране на N- и O-гликопептиди. Той предоставя информация както за гликановата структура, така и за центровете на гликозилиране и АК-та последователност на пептидите. Тази техника и метод се прилагат успешно за характеризиране на O-гликозилирани пептиди, съдържащи β -свързани GalNAc, свързани към серинови или треонининови остатъци. Също така се анализират гликопептиди, носители на Tn-антиген (GalNAc β 1), T-антиген дизахарид, или други O-гликани с по-дълги вериги.

Структурно охарактеризиране на гликани чрез фрагментационни йони

Структурата на гликаните се определя чрез проследяване и анализиране на получените йони при фрагментиране на йонизираната проба в MS/MS режим.

Пример за начина на фрагментиране на олигозахаридната верига е показан на Фиг. 27, като доминиращи в MS/MS спектъра са гликанови фрагментни представени чрез Y-и B-йоните. За точното определяне на конфигурацията на гликана се изисква и проследяване на:

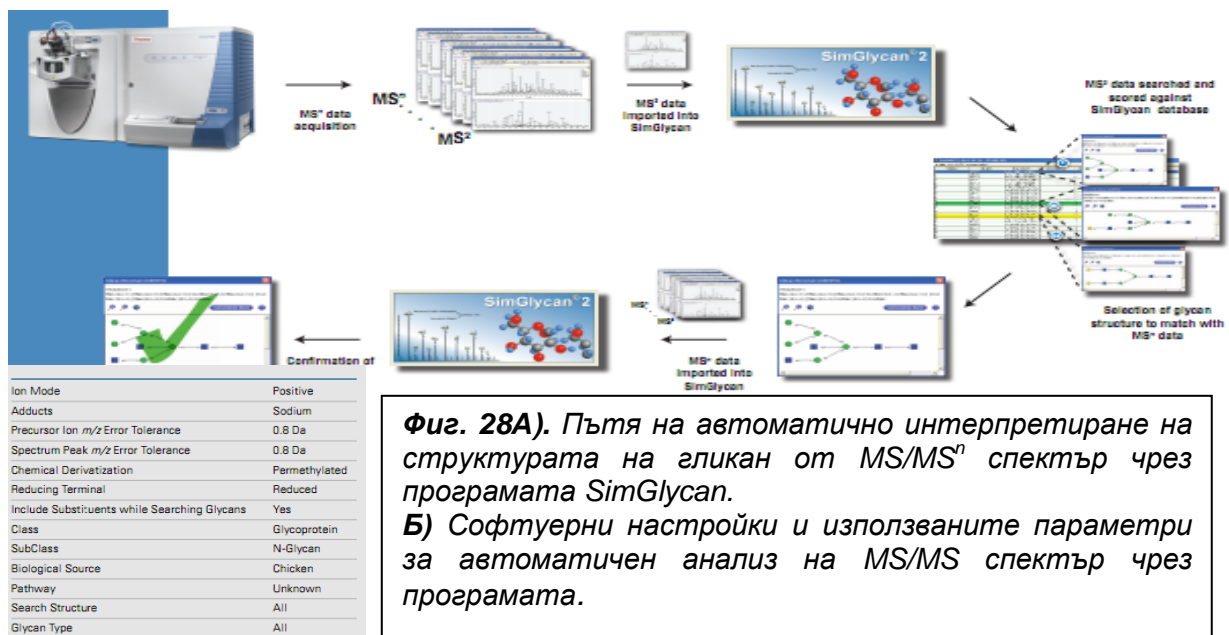
- C и Z йоните, които са производни на Y и B йоните,
- X и A фрагментни йони, получени от разкъсване на цикличните структури на монозахаридите.



Фиг. 27. Структура на O-свързан гликан, според фрагментационната номенклатура на Domon/Costello.

Автоматично определяне на структурата на гликани и гликопептиди

За определяне на структурата на гликаните е важен, както режима на фрагментация, така и точното интерпретиране на получените спектри. Чрез програмата SimGlycan® може да се направи прогноза за структурата на гликани и гликопептиди, като се използват експерименталните данни от MS/MS спектрите. Програмата търси съвпадения между данните от експериментално получения спектър и тези, които се съхраняват в база данни. Така чрез анализ на възможни теоретични фрагменти, програмата генерира набор от вероятни структури.

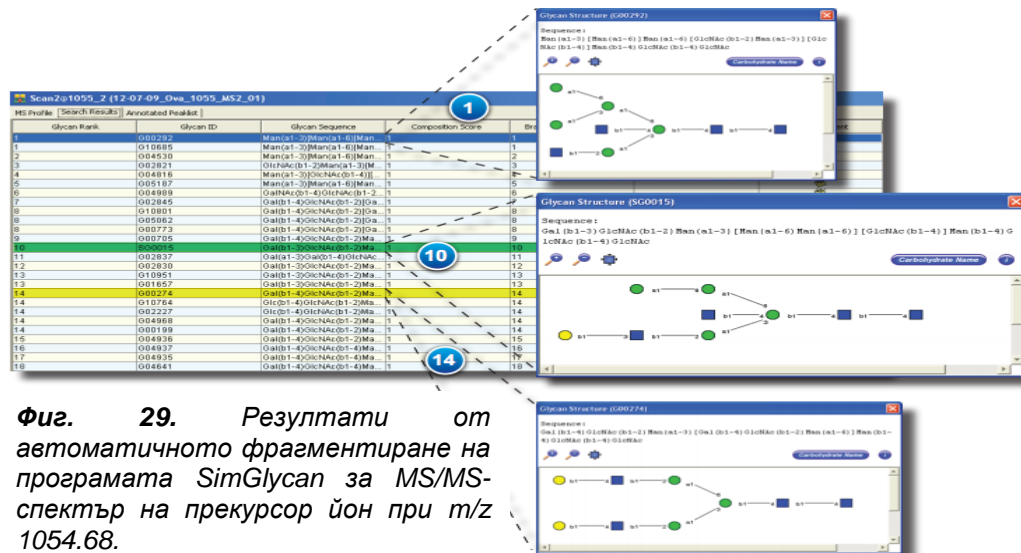


В случай на анализ на гликопептиди, получени от LC/MS/MS-анализ, програмата предоставя информация за възможния гликопротеин, към който принадлежи изследвания гликопептид, като например ID протеин, име на протеина, източник, класификация, аминокиселинна последователност на пептида, маса на пептида и т.н. На Фиг. 28А схематично е представен пътя на автоматично фрагментиране и анализ чрез програмата SimGlycan®

Друго голямо предимство е, че софтуерът работи директно с *.t2d и *.wiff файлове получени от редица масанализатори като ABSCIEX инструмент, Plus MALDI TOF/TOF™ анализатор 4000 Q-TRP® Q STAR® ElitSystem.

Програмата SimGlycan™ отчита експерименталните *m/z* стойности и интензивността на пиковете, генерирани от MS/MS анализи на гликани и гликопептиди. Преди да се активира автоматичното фрагментиране е необходимо да се въведат настройки на програмата (Фиг.28Б), като: използван йон режим, прекурсор йон при *m/z*, допустимо отклонение (грешка) *m/z*, дериватизацията на

гликана, ако има такава и др. След задаване на тези параметри, софтуерът SimGlycan™ осигурява следната информация за всяка вероятна гликанова структура: гликанови фрагменти; състав и маса на гликана; клас, реакция, пътека, ензими и други връзки към база данни CarbBank. На Фиг.29 е показан резултата от анализа на гликан, представен като двойно зареден йон в положителен режим на



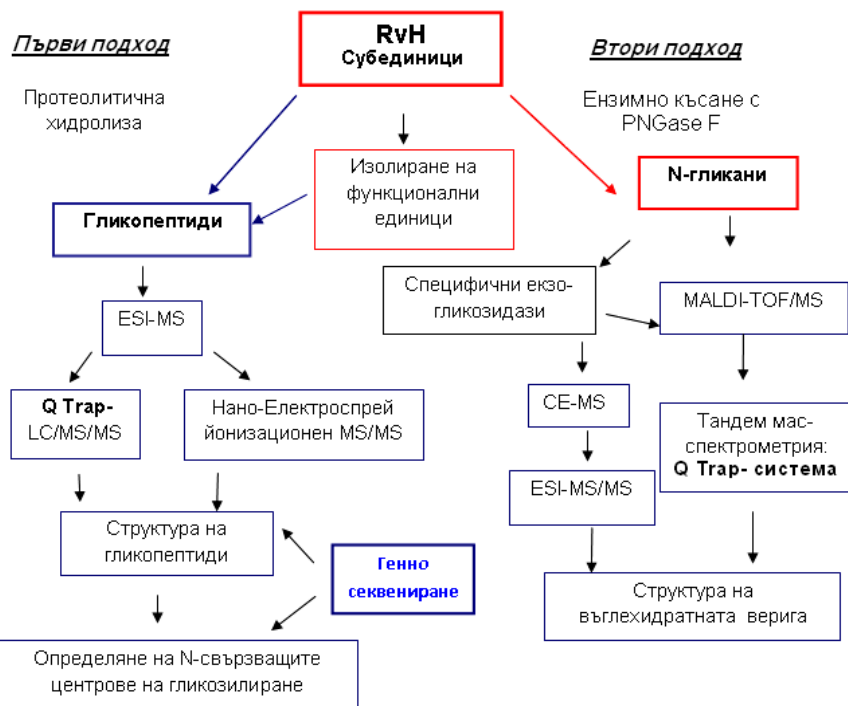
Фиг. 29. Резултати от автоматичното фрагментиране на програмата SimGlycan за MS/MS-спектър на прекурсор йон при m/z 1054.68.

SimGlycan™ разполага с огромна база данни, съдържаща над 8000 гликана, 5000 биологични източници, 4000 гликанови композиции, 6000 класове гликани, 204 биохимични реакции, 150 биохимични пътища и 184 гликан свързани ензими и над 8000 други връзки към база данни. Базата данни се актуализира непрекъснато, като се публикува информация за допълнителни гликани.

Стратегии и методи за анализ на гликопротеини

Общото в различните стратегии, използвани за характеризиране на гликопротеини е съчетаването на два основни подхода включваща - анализ на гликопептиди и гликани.

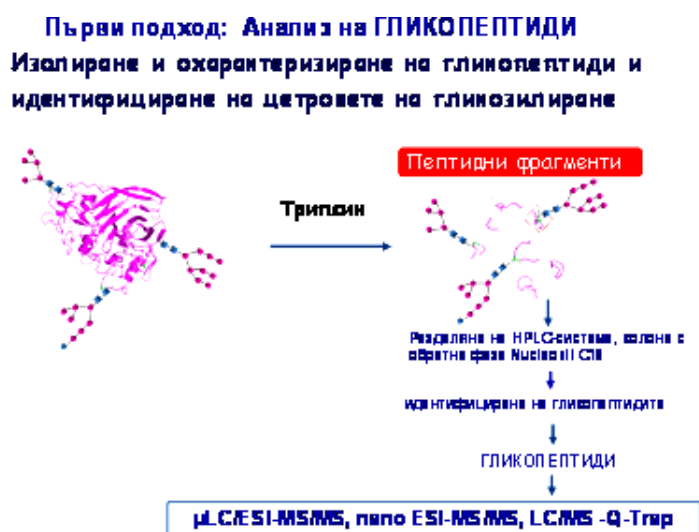
Тази два подхода са залегнали в разработената методика за определяне на въглехидратната структура на гликопротеин хемоцианин *RvH*. Тъй като понастоящем, първичната структура е частично известна, трябва да се извърши *de novo* MS/MS -фрагментиране на гликопептидите (Фиг. 30).



Фиг. 30. Стратегия за охарактеризиране на N-гликозилирането на хемоцианин RvH.

Анализ на гликопептиди

Първият подход е свързан с охарактеризиране на гликопептиди, изолирани от гликопротеини. Подходът включва редукция и алкилиране с цел определяне на N-края на полипептидната верига, последвани от ензимна хидролиза с трипсин на гликопротеина. Получените гликопептиди са анализирани на MALDI-TOF/TOF, LC/ESI-MS, нано-LC-ESI или Q-Trap-LC/MS/MS техники (Фиг. 31). Този подход дава възможност да се определят центрите на гликозилиране в пептидната верига и въглехидратната структура на олигозахаридната верига. За анализирането на пост-транслационните модификации е използвана комбинацията от гел и капилярна електрофореза, нано-LC и масспектрометрия.



Фиг. 31. Работна схема за масспектрометричен анализ на гликопептиди, след предварителна протеолиза на гликопротеина.

Анализ на гликопептиди чрез електроспрей йонизационна масспектрометрия (ESI-MS)

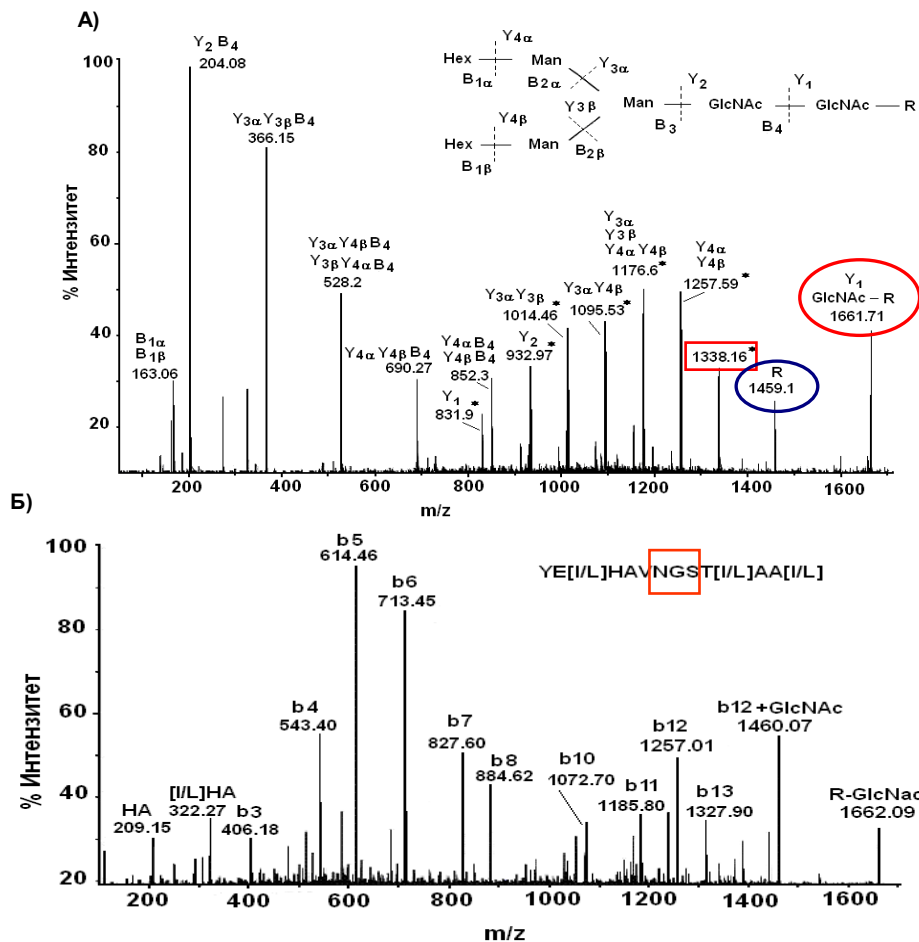
Електроспрей йонизацията е “мека техника” на йонизация, полезна за определяне на биологични молекули с големи молекулни маси, тъй като превръща макромолекулите в йонизирани малки капчици. Ето защо, ESI обикновено се използва за определяне на молекулните маси на протеини, пептиди и други биологични макромолекули.

ES йонизацията и дисоциацията индуцирана от сблъсък (CID) в масспектрометри с троен квадрупол е най-често използваната техника за анализ на гликопептиди, при което са установени някои от ключовите характеристики на гликопептидите. Олигозахаридните структури на гликопептидите се анализират чрез интерпретиране на различно заредените йони $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+3H]^{3+}$ от MS/MS спектрите. Прилагането на този метод дава възможност за фрагментиране както на олигозахаридната, така и на пептидната верига. При повишаване на напрежението в йонизиращия източник на фрагментация от 60V до 100V (псевдо-MS³ експеримент) въглехидратната верига може да бъде отделена от пептидната. Така освободеният пептид, който остава свързан само с един HexNAc монозахариден остатък, може да бъде фрагментиран в хексаполната клетка на сблъсък.

Представен е анализа с нано-поточен електроспрей-йонизационен масспектрометър (ESI-MS) на гликопептид, получени след ензимна хидролиза с трипсин на хемоцианин от *R. venosa* (RvH). Определени са масата на гликопептида, гликановата структура и са идентифицирани местата на свързване на гликана към пептида. На Фиг. 32 е показан MS/MS спектър на гликопептид представен като двойно протониран йон $[M+2H]^{2+}$ при m/z 1338.16. В MS/MS спектъра (Фиг.6A) се наблюдават характерните за фрагментиране на гликани единично заредени йони с висок интензитет при m/z 204.08 (HexNAc) и 366.15 (HexHexNAc), които са последвани от други единично заредени йони $[M+H]^+$ при m/z 528.2 (Hex₂HexNAc), 690.27 (Hex₃HexNAc), 852.3 (Hex₄HexNAc) и 1014.46 (Hex₅HexNAc).

Поредицата от двойно заредените йони $[M+2H]^{2+}$ при m/z 1257.59 ($Y_{4\alpha}/Y_{4\beta}$), m/z 1176.6 ($Y_{4\alpha}Y_{4\beta}/Y_{3\alpha}/Y_{3\beta}$) и при m/z 1095.53 ($Y_{3\alpha}Y_{4\beta}$), отразява последователното фрагментиране само на крайно свързаните монозахаридни остатъци на олигозахаридната верига, която остава свързана с пептидната по време на

експеримента (Фиг. 32А). От интерпретацията на посочените йони бе определена въглехидратна структура от класически високоманозен тип (Фиг.32А).



Фиг. 32. Спектър на фрагментиране на гликопептид G1 определен като $[M+2H]^{2+}$ при m/z 1339.16. **А)** Нано-електроспрей йонизационен MS/MS анализ на въглехидратния остатък (енергия на сблъсък 37 eV). Представена е въглехидратна структура на олигозахаридния остатък. **Б)** Псевдо-MS/MS/MS експеримент на пептидия остатък, свързан с един HexNAc при m/z 1662.09, (коносов волтаж 95V и енергия на сблъсък от 80eV). Зареденият йон при m/z 1661.11, съответства на N-гликозилирания пептид, свързан с един GlcNAc остатък при Asp. Самият пептид е обозначен с R- при m/z 1459.75.

От MS/MS спектърът на Фиг. 32А бе определено, че на фрагментният йон (R-GlcNAc) при m/z 1661.71, съответства на пептида R- при m/z 1459.1, гликозилиран с един GlcNAc остатък. Точно този йон бе подложен на следващо фрагментиране след повишаване на напрежението в източника на йонизация и енергията на сблъсък.

След проследяване на стойностите на b-йоните в масспектъра (Фиг.6Б) бе определена АК-та последователност на пептидната верига YEXHAVNGSTXAAH и бе установен един N-свърващ център на гликозилиране (-NGS-). Определеният център на гликозилиране е част от типичния мотив за N-гликани с аминокиселинна последователност N-aa-S/T, където -aa- може да бъде всяка

аминокиселина, освен пролин. В предложената АК последователност, остатъка X би могъл да бъде левцин или изолевцин, тъй като двата АК остатъка трудно могат да бъдат различени чрез приложения MS метод.

Този метод може да бъде използван за анализиране на N- и O- свързани гликопептиди.

Анализ на гликопептиди, чрез Q-Trap LC/MS/MS система

MS анализът на гликопептиди се извършва само след обстойно пречистване на HPLC система, след което се анализират на Q-TOF или ESI-MS. На практика характеризирането на гликопептиди е много трудно, защото те често представляват сложни смеси, съдържащи пептиди и гликопептиди. Стратегиите, прилагани за тази цел се състоят в генериране на диагностични фрагментни йони в MS режим (без избор на прекурсорен йон) и/или MS/MS режим (с избор на прекурсорен йон).

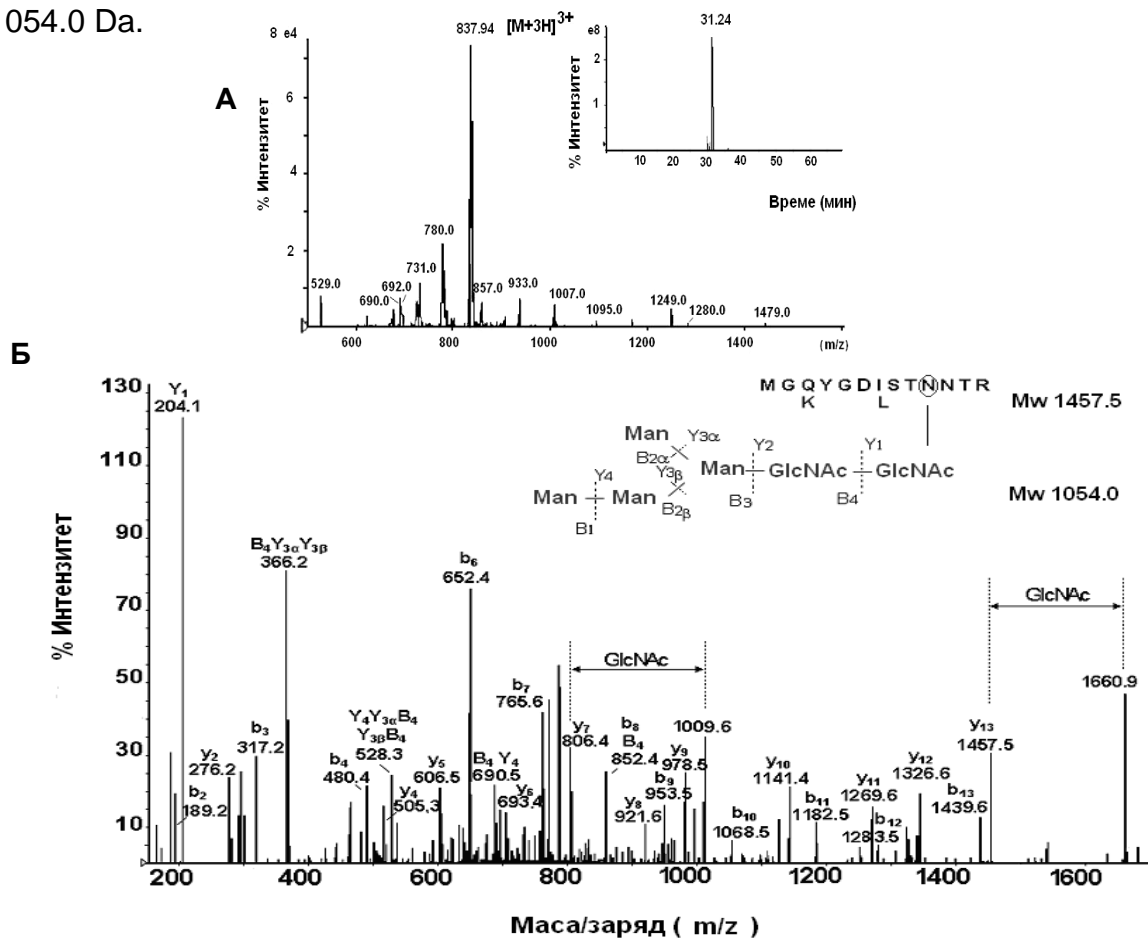
Тандем маспектрометрията е съвременен метод, с който се определят както центрове на гликозилиране, така също и свързаните към тях въглехидратни вериги. Комбинацията на две системи: течен хроматограф с маспектрометър (LC/MS) и/или Q-Trap системата, с наноспрей йонизационен източник, дава възможност за тройно квадруполно сканиране и паралелно секвениране на въглехидратната и пептидна структура на изследвания гликопептид.

Анализирането на изследвания гликопептид се извършва в MS- и MS/MS-режим при повишена резолюция в маса-обхват до m/z 1700, енергията в клетката на сблъсък е между 25 и 50 eV. Използването на този метод дава възможност селективно да се анализират и гликопептиди, присъстващи в много ниски концентрации в изследваната проба. Гликопептидите в протеолитичната смес се анализират селективно чрез извършване на предварително йонно сканиране за наличие на маркерни йони m/z 163 ($[\text{Hex}+\text{H}]^+$), m/z 204 ($[\text{HexNAc}+\text{H}]^+$) или m/z 366 ($[\text{Hex-HexNAc}+\text{H}]^+$), произлизащи от фрагментирането на олигозахаридните вериги.

Този метод бе приложен за изследване на изолираните на HPLC-система фракции от структурните субединици RvH1 и RvH2, след ензимна хидролиза с трипсин, които бяха идентифицирани като гликопептиди съгласно проведените тест с орцинол/сярна киселина. На Фиг.33 А, е показан LC/MS/MS анализът на елуираната фракция на 31.24 мин. от хроматограмата. Предварителното йонно сканиране на тази фракция при m/z 204 $[\text{HexNAc}+\text{H}]^+$ и при m/z 366 $[\text{Hex-HexNAc}+\text{H}]^+$, дава възможност селективно да бъде анализиран само чистия

гликопептид. От MS-спектъра бе установен само един доминиращ тройно зареден йон $[M+3H]^{3+}$ при m/z 837.97 (Фиг.33А), от който бе определена маса от 2511.91 Da за сканирания гликопептид.

Въглехидратната структура на гликопептида, бе определена (от MS/MS спектъра на Фиг.33Б) чрез проследяване на типичните йони, получени от фрагментирането на въглехидратната верига (представени като Y и B йони, съответстващи на номенклатурата на Domon/Costello) при m/z 204.1 (GlcNAc), m/z 366.2 (HexGlcNAc), m/z 528.3 (Hex₂GlcNAc), 690.5 (Hex₃GlcNAc), и 852.4 (Hex₄GlcNAc). Така бе идентифицирана въглехидратна структура от високоманозен тип (Hex₁Man₃GlcNAc₂), изградена от 4 Hex и 2 GlcNAc с маса 1054.0 Da.



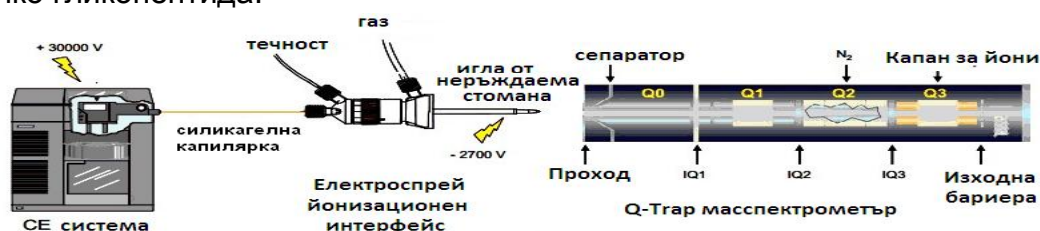
Фиг. 33. А) Прекурсорно йонно сканиране при 31,24 мин. от хроматографското разделяне (вмъкнатата малка фигура) и сканиране (EPI) при повишена резолюция на тройно заредения йон при m/z 837.97. **Б)** MS/MS спектър на тройно заредения йон при m/z 837.97, съответстващ на гликопептид с маса 2511.91 Da

След проследяване на у- и б-йоните в MS/MS-спектъра на тройно заредения йон $[M+3H]^{3+}$ при m/z 837.97, бе определена АК последователност на пептида - MGQYGD(I/L)STNNTR (Фиг.33Б). Йонът y_7 при m/z 806.4 съответства на пептидния фрагмент -(I/L)STNNTR от С-края на пептидната верига. Наблюдаваният интензивен йон при m/z 1009.6 представлява същият този фрагмент, но свързан с

един монозахариден GlcNAc остатък. От друга страна йонът при m/z 1660.9 съответства на пептидия йон y_{13} (m/z 1457.5), гликозилиран с един GlcNAc остатък. Това доказва, че определеният свързващ център -NNT- е действително гликозилиран с олигозахаридната верига, чиято структура бе определена по-горе.

Анализ на гликопептиди чрез капилярна електрофореза (CE) и ESI-MS/MS

Използването на тандем маспектрометрия (капилярна електрофореза в комбинация с MALDI-MS, ESI-MS и Q-Trap-MS/MS (Фиг.34), дава възможност за определяне на въглехидратната структура и центрoвете на гликозилиране на смес от няколко гликопептида.



Фиг. 34. Комбинация от CE, ESI и Q-Trap MS/MS система.

Така например, комбинирайки CE, MALDI-MS, ESI-MS и хидролиза със специфични гликозидази е определена въглехидратната структура на функционалните единици RvH1-a и RvH1-f.

Гликопептидите изолирани от RvH1-a и RvH1-f на HPLC с колона RP Nucleosil C18, бяха анализирани с лазер десорбционен маспектрометър (MALDI-MS) преди и след третиране с PNGase-F (Табл.3), с цел определяне на масите на всеки един от изследваните гликопептиди, както и масите на въглехидратните и пептидните вериги.

Таблица 3. Представени са масите на гликопептидите изолирани от ФЕ-ци RvH1-a и RvH1-f на хемоцианин от *R. venosa*, измерени с MALDI-MS преди и след третиране със специфичната гликозидаза PNGase-F.

Фракции	Аминокиселинна последователност	Гликопептид Mw (Da)	Пептид Mw (Da)	Олигозахарид Mw (Da)
Glp 1 RvH1-a	FANATSIDGPNA	2786 [2763 + Na] ^a	1177.0 ^a 1177.5 ^b	1609 [1586 + Na] ^a
Glp 2 RvH1-a	EMLTLNGTNLA	2846.2 [2828 + H] ^a	1175.7 ^a 1175.6 ^b	1653 [1652 + H] ^a
Glp 3 RvH1-f	HSYSGSYINASLLHGPSII	3848 [3847 + H] ^a	2940 ^a	907 [906 + H] ^a

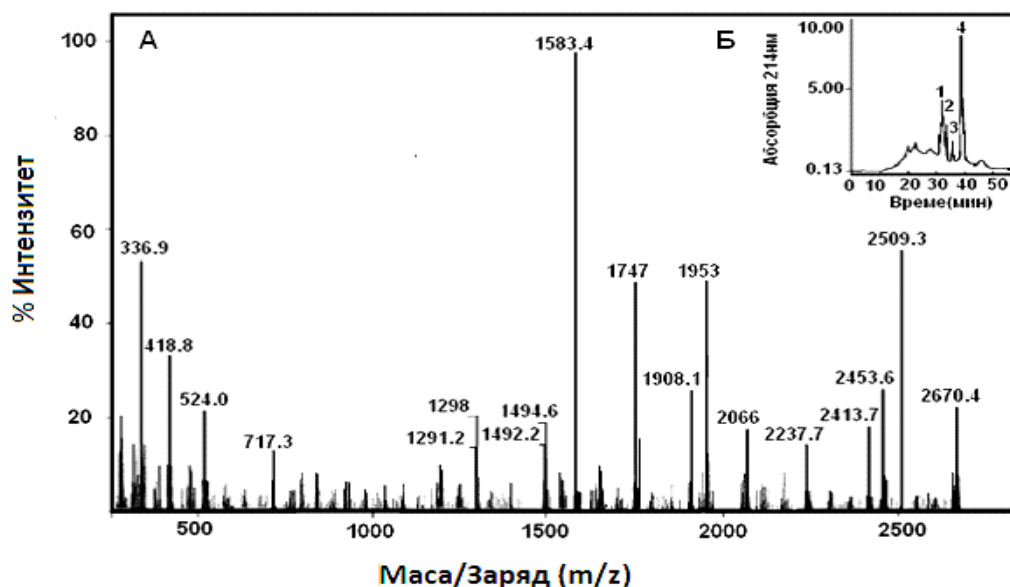
а) Молекулна маса, измерена с MALDI-MS.

б) Молекулна маса, изчислена от АКП, получена чрез Едманово деградиране.

В MALDI-MS спектъра на Гликопептид 1 (Glp1), получен преди ензимната хидролиза с PNGase-F бе наблюдаван само един молекулен йон при m/z 2786,

съответстващ на масата на целия гликопептид плюс един натриев йон $[Glp1+Na]^+$. След третиране с PNGase-F, в MALDI-MS спектъра бяха наблюдавани три сигнала: сигналът при m/z 2786 - съответства на целия гликопептид Glp1, вторият сигнал при m/z 1609 - отговаря на масата на гликана $[M+Na]^+$, а третият сигнал при m/z 1177 съответства на пептида получен след дегликозилиране, което бе потвърдено и от масата на пептида, изчислена от аминокиселинната му последователност Таб. 3.

За определянето на въглехидратната структура на гликопептид Glp1 изолиран от RvH1-a, са използвани специфични екзогликозидази, като β 1-2,3,4,6-GlcNAc-зидаза, α 1-2,3-манозидаза, α 1-2,3,6-манозидаза, β 1-3,4,6-галактозидаза, с помощта на които са идентифицирани различните места на свързване на монозахаридните остатъци от въглехидратната верига. Получените фракции са изолирани чрез капилярна електрофореза и анализирани с електроспрей йонизационен масспектрометър (ESI-MS) (Фиг.35).



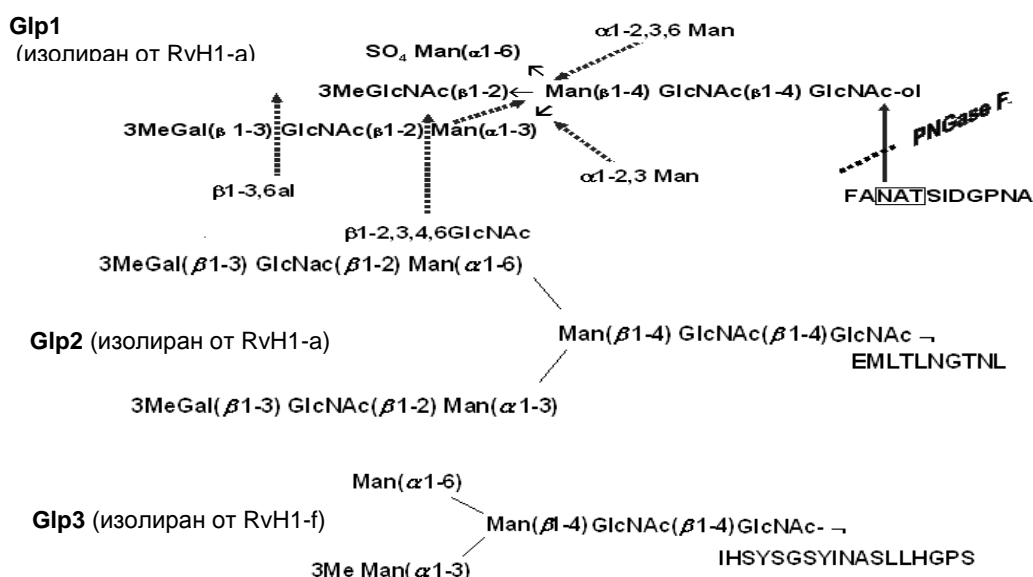
Фиг. 35. ESI-MS/MS -спектър и капилярна електрофореза на Glp1 след ензимно разкъсване на гликопептид Glp 1 със специфични гликозидази: β 1-2,3,4,6-GlcNAcase, α 1-2,3,6-манозидаза и α 1-2,3-манозидаза; (малката диаграма) Капилярна електрофоророграма на Glp 1 след третиране с различни гликозидази

На капилярна електрофоророграма се наблюдават няколко фракции, получени в резултат на хидролиза със специфични гликозидази на въглехидратната верига. След последователното им анализиране чрез ESI-MS и коректно интерпретиране на получените данни (Таблица 4) е определена структурата на този гликан, представена на Фиг. 36.

Таблица 4. Анализ на структурата на въглехидратната верига, свързана към пептид със АК последователност FANATSIDGPNA (1177 Да), определена на базата на наблюдаваните фрагментни йони $[M+H]^+$ в ESI-MS

No	Ензими	$[M+H]^+$ (m/z)	Структура на гликопептид Glp1
1	α -1-2,3-манозидаза, и α -1-2,3-6-манозидаза, β 1-2,3,4,6-N-GlcNac-аза	1747	\leftarrow Man(β 1-4) GlcNac(β 1-4) GlcNac -P
2	α -1-2,3-манозидаза, β 1-2,3,4,6-N-GlcNac-аза	1908	Man(α 1-6) \nwarrow \leftarrow Man(β 1-4) GlcNac(β 1-4) GlcNac -P
3	α -1-2,3-6-манозидаза, α -1-2,3-манозидаза	1953	3MeGlcNac(β 1-2) \leftarrow Man(β 1-4)GlcNac(β 1-4)GlcNac-P
4	β 1-2,3,4,6-N-GlcNac-аза	1583	-GlcNac(β 1-4) GlcNac-P

Същите методи (капилярна електрофореза в комбинация с MALDI-MS, ESI-MS и Q-Trap-MS/MS) са приложени за определяне на въглехидратната структура и на други гликопептиди, изолирани от функционалните единици RvH1-a (Glp2) и RvH1-f (Glp3) (Фиг.36).



Фиг. 36. Олигозахаридна структура на гликопептиди Glp1, Glp2 и Glp3 изолирани от RvH1.

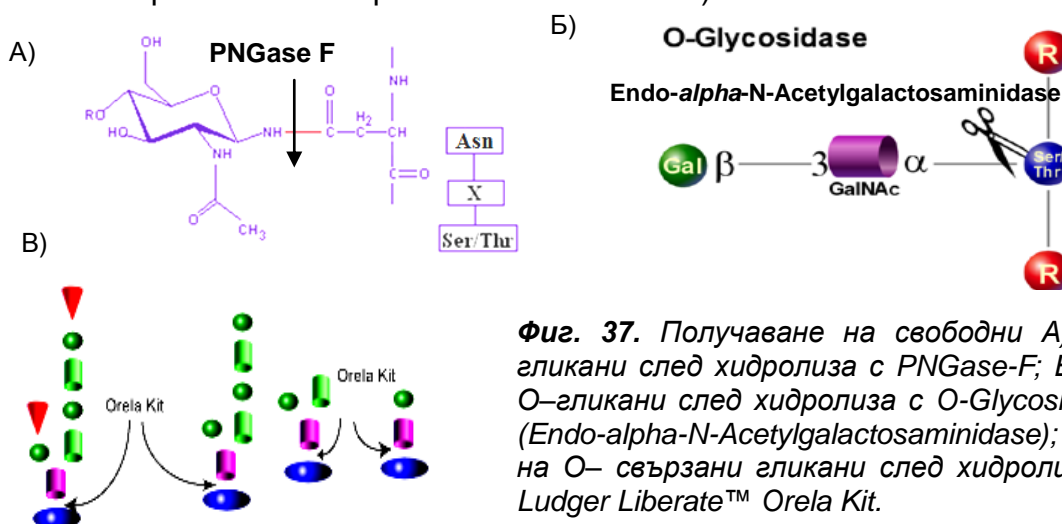
Приложената методика е високо информативна, но има няколко съществени недостатъци, а именно изисква голямо количество гликопротеин, отнема много време и е твърде скъпа. Поради това, за по нататъшните анализи бяха използвани други по-съвременни методи и техники.

Използването на първия подход от разработената методика за анализиране на въглехидратната структура има някои недостатъци. Интерпретирането на сложни антени олигозахаридни структури от комплексен тип се извършва трудно поради фрагментирането на АК остатъци от пептидната верига. Това налага и използване на втори подход.

Анализ на гликани

Вторият подход включва охарактеризиране на гликани, получени след дегликозилиране на гликопротеина със специфични гликозидази (Фиг. 37) и прилагане на различни масспектрометрични техники, като MALDI-TOF/TOF, CE-MS/MS, Q-Trap–масспектрометър и др. Този подход дава възможност за определяне на сложни антени олигозахаридни структури.

Ендогликозидазата PNGase F е подходяща за освобождаване на N–гликани, а O-Glycosidase (Endo- α -N-Acetylgalactosaminidase) и Orela Kit се използват за дегликозилиране на O–свързани гликани (Фиг.37).



Освен, ензимно дегликозилиране се прилага и химическо освобождаване на гликаните, което не е толкова специфично. От скоро е разработен нов ефективен метод, при който лесно се извършва дегликозилиране с трифлуорометансулфонова киселина (TFMS). Този метод е полезен с това, че не води до пълното унищожаване на протеиновата част и позволява последващ протеомен анализ [Edge A., 2003, Edge A., 1981]. Методът се основава на откритието, че O- и N- гликозидните връзки са чувствителни към разцепване от TFMS и пептидните връзки остават непокътнати, дори и след удължено дегликозилиране.

За определяне на въглехидратните структури на хемоцианин, изолиран от морски охлюв *R. venosa*, бяха използвани различни методи и техники, като MALDI-TOF-MS и Q-Trap–масспектрометър, след ензимно освобождаване на N-гликаните от полипептидните вериги на структурните субединици RvH1 и RvH2. Дегликозилирането на RvH1 и RvH2 бе проведено в денатуриращ разтвор (1% SDS, 0.5 M меркаптоетанол, 0.1 M EDTA), като N-гликани бяха отделени от протеина след 20 часова инкубиране със специфичния ензим PNGase F (Фиг. 37).

Освободените гликани бяха пречистени от реакционната смес на колона Carbohydrate, елуирана с 25% ацетонитрил/0.05% трифлуороцетна киселина.

В някои случаи може да се приложи предварително маркиране на гликаните чрез редукционно аминране с 8-аминопирен-1,3,6-трисулфонат (APTS), 3-аминопиразол (3-AP), 2-аминобензоена киселина (2-AA) и др, след което маркираните гликани се анализират чрез HPLC и тандем маспектромертия. Тази стратегия може да осигури "гликанов профил" или "модел на гликозилиране", което е изключителна важна характеристика на гликопротеините. Чрез дериватизацията на олигозахаридите с APTS се постига висока резолюция при анализ със CE, което позволява едновременно определяне на заредени и незаредени гликани, както и улеснява интерпретацията на спектрите.

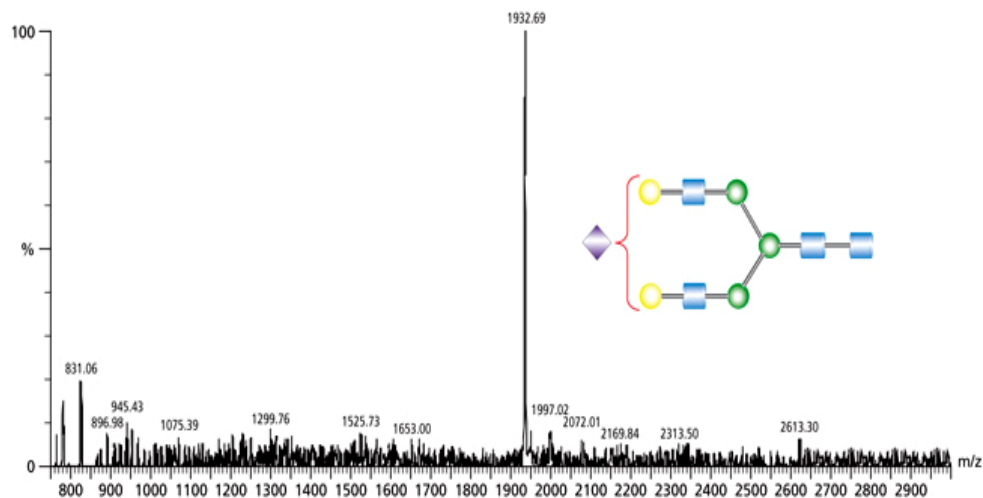
MALDI-MS анализи на неутрални и кисели гликани

MALDI-MS анализите на неутрални и кисели гликани се провеждат в различен режим на йонизация и различни матрици.

Неутралните гликани се идентифицират ефективно при измерване в режим на положителна йонизация и използване на матрица 2,5-дихидроксиензоена киселина (2,5-DHB), но чувствителността се увеличава при използването на "Super 2,5-DHB" матрица, която предлага "по-мека" десорбция. "Super 2,5-DHB" матрицата съдържа смес от 2,5-DHB и 2-хидрокси-5-метоксибензоена киселина (в отношение, съответно 9:1 тегловни %). Неутралните гликани за разлика от киселите, показват ниска йонизационна способност и по тази причина $[M+H]^+$ йоните не се продуцират в достатъчно количество. Тези гликани могат да бъдат детектирани чрез добавяне на алкален метал, който йонизира пробата ефективно. Обикновено в маспектъра главният йон е $[M+Na]^+$, или $[M+K]^+$. Включването на NaCl в матричния солвент позволява на гликаните да се йонизират предимно като $[M+Na]^+$ йони.

MALDI-MS анализите на киселите гликани (съдържащи сиалови монозахаридни остатъци) с DHB-матрица, обикновено дават смес от катионни адукти, пораждащи променливи слаби сигнали, поради загубите на сиалови остатъци или карбоксилни групи, което води до мултиплетни пикове. Ето защо алтернативен път е изборът на различна матрица, която може да превъзмогне проблема с фрагментиране по време на анализа и да доведе до увеличаване на границата на детекция. Най-широко използваните матрици за анализ на кисели гликани са 6-азо-2-тиотиамин и 2,4,6-три-хидрокси-ацето-фенон (THAP) (Фиг. 38). С THAP детекционната граница на анализ може да бъде изключително висока - 10

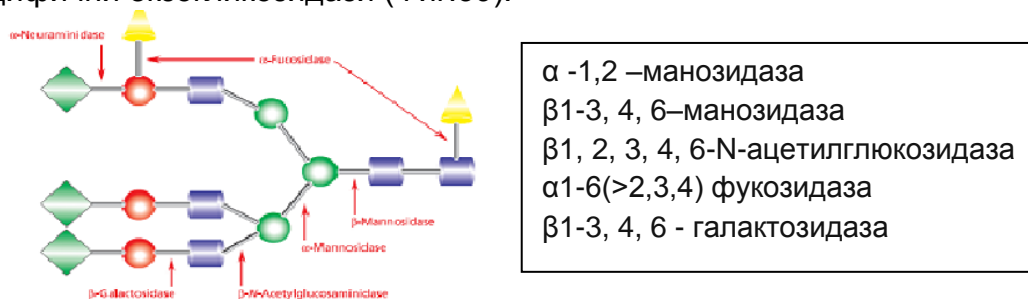
fmol, ниво за откриване на много малки концентрации на фрагменти в линейния метод.



Фиг. 38. MS-спекър на моносиализиран N-гликан, представен, като $[MH]^-$ йон при m/z 1932.69, на MALDI-TOF, получен в отрицателен линеен режим на йонизация, с матрица 2,4,6-три-хидрокси-ацето-фенон (THAP).

Структурно характеризирание на гликани чрез MALDI-TOF

Частична информация за структурата на гликаните, може да бъде получена чрез предварителното им анализиране с MALDI-TOF/MS преди и след третиране със специфични екзогликозидази (Фиг.39).



Фиг. 39. Някои от най-често използваните екзогликозидазни ензими за определяне на структурите на N-свързани гликани, при анализи с MALDI-MS.

При сравняване на получените MS спектри се получава информация за структурите на гликаните, вида и начина на свързване на монозахаридните остатъци. Неутралните гликани се йонизират в режим на положителна йонизация с подходяща 1 μ L матрица (най-често 10 мг/мл 2,5-дихидрокси-бензоена киселина в 50% ацетонитрил). Регистрираните MS-спектри са в обхват от m/z 900 до m/z 3000.

След ензимно дегликозилиране на структурната съединица HtH1 с PNGase F, изолираните и пречистени гликани бяха анализирани чрез MALDI-TOF-MS преди (Фиг. 40 A) и след третиране със специфичните екзогликозидази β1-3,4,6-

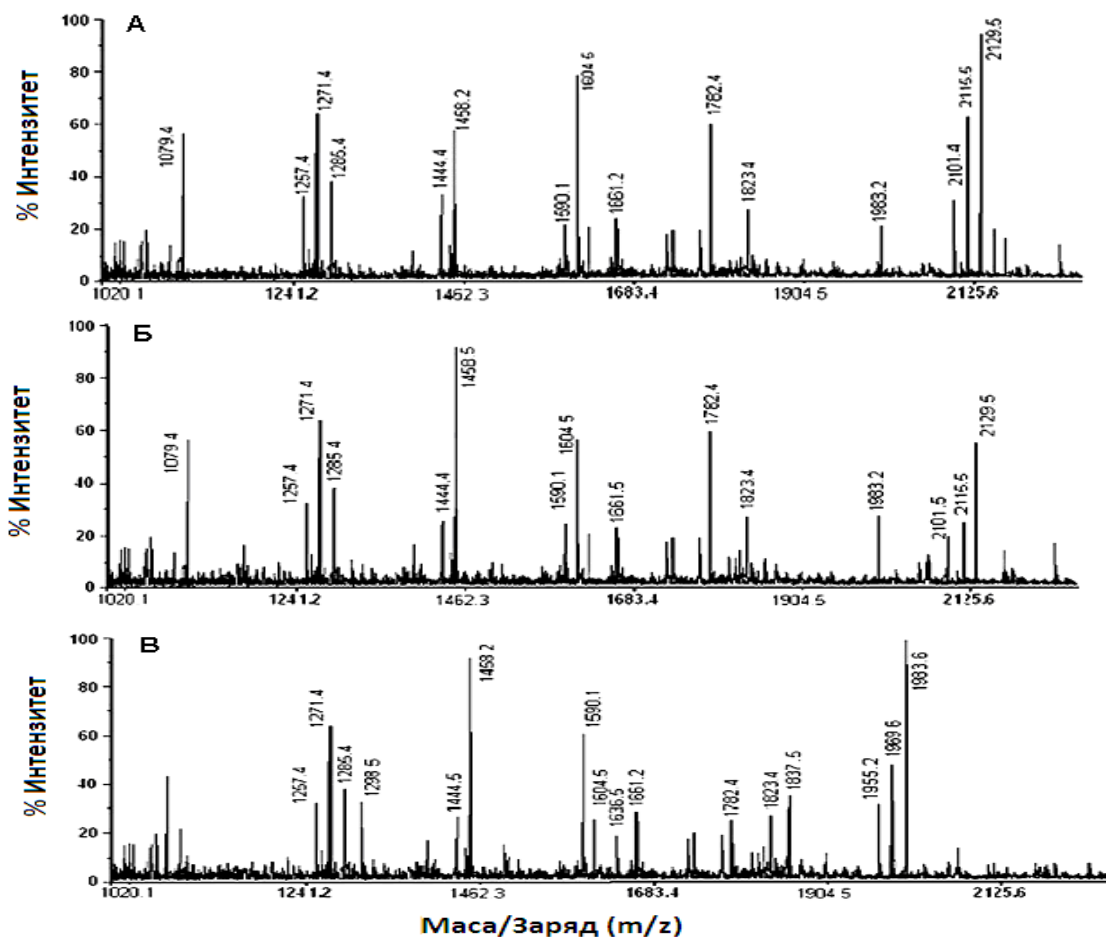
галактозидаза (Фиг. 40 Б) и α 1-6(>2,3,4) фукозидаза (Фиг. 40В). Сравняването на получените йони в трите MS-спектри (Фиг. 40 А, Б, В), дава предварителна информация за вида на монозахаридните остатъци и начина им на свързване в олигозахаридната верига.

MS-спектрите, представени на Фиг.40 А и 40Б, показват, че масите на изходните гликани не се променят значително след третиране с β 1-3,4,6-галактозидаза. Това подсказва, че анализираниите гликани вероятно нямат β 1-3,4,6-свързани галактозни остатъци.

Идентифицирането на фукозните остатъци (Fuc) и начина им на свързване в олигозахаридните вериги бе установено чрез третиране на изходните N-гликани със специфичната α 1-6(> 2,3,4) фукозидаза, която преимуществено откъсва α 1-6 свързани Fuc остатъци, свързани към GlcNAc. Сравняването на MALDI-TOF MS спектрите (Фиг. 40А и 40В), показва, че N-гликаните търпят значителни промени след инкубиране със α 1-6(>2,3,4) фукозидаза. В резултат на късане на α 1-6 свързаните фукозни остатъци във въглехидратната верига йоните при m/z 2129.5, 2115.5, 2101.4 и 1079.4 от Фиг.56А изчезват и се появяват нови при m/z 1969.6, 1955.6, 1837.5, 1636.5 и 1298.5, (Фиг.56В). Последните йони са произлезли от съответните гликани при m/z 2115.1, 2101.4, 1893.4, 1782.4 и 1444.4, след отстраняване на един (α 1-6)Fuc – остатък (146 Da), който обикновено е свързан към HexNAc от пентазахаридната сърцевина.

Други наблюдавани промени в трите MS спектри са свързани с промяна на интензитета на йоните при m/z 1983.6, 1590.1 и 1458.2, който значително нараства, докато при йони с m/z 1782.4 и 1604.5 – намалява, след третирането с α 1-6(>2,3,4) фукозидазата. Повишеният интензитет на йоните при m/z 1983.6 и 1458.2 вероятно се дължи на премахването на α 1-6-Fuc от гликани при m/z 2129.5 и 1604.4 (Фиг.56В). Интензитетът на йоните при m/z 1257.4, 1271.4, 1285.4 и 1823.4 не се променя, което подсказва, че (α 1-6) Fuc остатък не присъства в структурата на тези гликани.

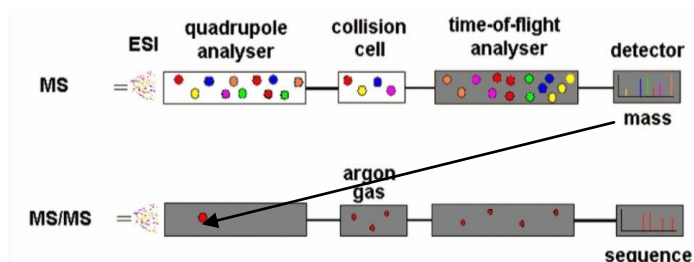
MALDI-TOF-MS анализ преди и след третиране на гликани със специфична α 1-6(>2,3,4) фукозидаза и Q-Trap-MS/MS анализ, дават възможност да бъдат определени структурите, съдържащи свързана (α 1-6) Fuc към GlcNAc от пентазахаридната сърцевина.



Фиг. 40. MALDI-TOF-MS спектри на N-гликани изолирани от HtH1 преди (A) и след третиране със специфичните екзогликозидази β 1-3, 4, 6 - галактозидаза (B) и α 1-6(>2, 3, 4) фукозидаза (B).

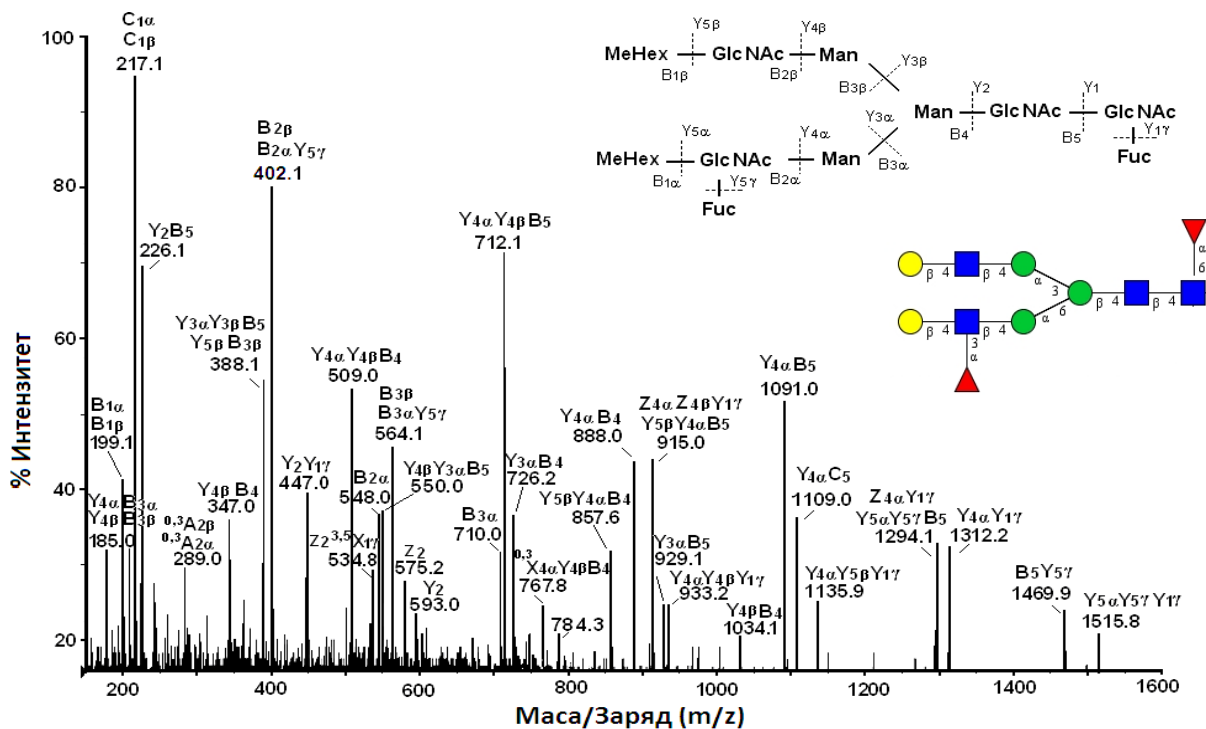
Определяне на въглехидратната структура на гликани чрез Q-Trap система

Точният анализ на монозахаридите остатъци и определяне на въглехидратните структури на гликаните бе постигнат чрез тандем-маспектрометрия на Q-Trap система. От MS спектъра може да бъде определена масата на гликаните, като Na-адукти, чрез единични $[M+Na]^+$ и двойно $[M+2Na]^{2+}$ заредени йони. Използването на Q-Trap тандем маспектрометрия (хибриден квадруполно-линеен мас-спектрометър с йонен капан), позволява да бъде определена структурата на всеки един от гликаните измерен в MS-режим, чрез фрагментиране в MS/MS – режим на положителна йонизация (Фиг. 41).



Фиг. 41. Схема на Q-Trap тандем маспектрометрия.

Използвайки този метод бе определена сложната комплексна структура на гликан $\text{MeHex}_2\text{HexMan}_3\text{GlcNAc}_4\text{Fuc}_2$, след фрагментиране на двойно зареден йон $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$ при m/z 1002.8 (Фиг. 42). Както е показано в MS/MS-спектъра (Фиг. 42), два дезоксихексозни остатъка (Fuc) и два крайни метилирани хексозни остатъка (MeHex) са свързани към GlcNAc остатъци на гликановата верига. Няколко йона: $\text{Z}_2^{3,5}\text{X}_{1\gamma}$ при m/z 534.8, Z_2 при m/z 575.2 и Y_2 при m/z 593.0, потвърждават наличието на $(\alpha 1-6)\text{Fuc}$, свързана към GlcNAc от пентазахаридната сърцевина.



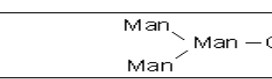
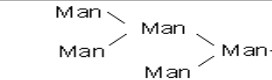
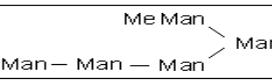
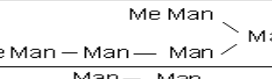
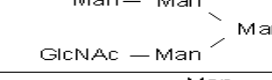
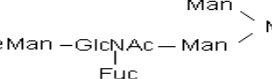
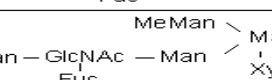
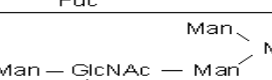
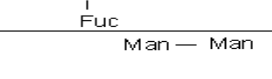
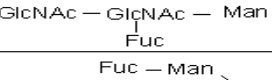
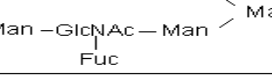
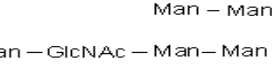
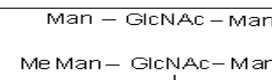
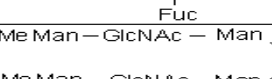
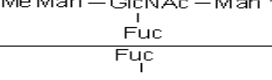
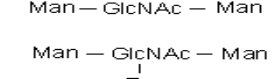
Фиг. 42. MS/MS спектър на гликан, представен като двойно зареден йон при m/z 1002.8 $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$, изолиран от HtH1, (вътре) структура на гликана представена с фрагментационна номенклатура.

Йоните $\text{B}_{2\alpha}$ при m/z 548.0 и $\text{B}_{3\alpha}$ при m/z 710.0 са доказателство за наличие на $(\alpha 1-3)\text{Fuc}$, свързана към GlcNAc, а йоните $\text{B}_{3\beta}$ при m/z 564.1 и $\text{B}_5\text{Y}_{5\gamma}$ при m/z 1469.9 допълнително подкрепят предложената структура, която включва два крайно свързани MeHex остатъци. Полученият йон $\text{Y}_{4\beta}\text{B}_4$ при m/z 1034.1 съответства на монозахаридната композиция $\text{Man}_3\text{GlcNAcFucMeHex}$ (съдържаща крайна $(\alpha 1-3)\text{Fuc}$, свързана към GlcNAc). Следователно фрагментният йон $^{0,3}\text{X}_{4\alpha}\text{Y}_{4\beta}\text{B}_4$ при m/z 767.8 е получен от йона $\text{Y}_{4\beta}\text{B}_4$ при m/z 1034.1 след отделяне на йонния фрагмент $^{0,3}\text{A}_{2\alpha}$ (при m/z 289.0) съдържащ MeHex остатък. Тези йони доказват и потвърждават, че предложената структура съдържа $\text{Fuc}(\alpha 1-3)\text{GlcNAc}$. Доказателство за наличие на крайно свързани MeHex остатъци към GlcNAc, наблюдаващи се във въглехидратните структури на повечето хемоцианини от молуски, се явяват йоните $\text{C}_{1\alpha}$ или $\text{C}_{1\beta}$ при m/z 217.1, йоните $\text{B}_{2\beta}$ и $\text{B}_{2\alpha}\text{Y}_{5\gamma}$ при m/z

402.1, както и йоните $B_{3\beta}$ и $B_{3\alpha}Y_{5\gamma}$ при m/z 564.1. Двете алтернативни интерпретации на сигнала при m/z 1294.1, като $Y_{5\alpha}Y_{5\gamma}B_5$ и $Z_{4\alpha}Y_{1\gamma}$ потвърждават позицията на двата Fuc-остатъка в предложената структура на гликановата верига (Фиг. 42).

По този начин бяха определени 16 въглехидратни структури на N-гликани, изолирани от HtH1 след дегликозилиране с PNGaseF (Таб. 5).

Таблица 5. Въглехидратни структури на N-гликани, изолирани от HtH1

№	Glycan's structures from HtH1	Q-Trap/MS (m/z)	MALDI-TOF/MS (m/z)
1		[M+H] ⁺ 1056.8	[M+Na] ⁺ 1079.4
2		[M+H] ⁺ 1235.0	[M+Na] ⁺ 1257.4
3		[M+H] ⁺ 1248.6	[M+Na] ⁺ 1271.4
4		[M+Na] ⁺ 1285.0	[M+Na] ⁺ 1285.4
5		[M+H] ⁺ 1422.0	[M+Na] ⁺ 1444.4
6		[M+H] ⁺ 1436.0	[M+Na] ⁺ 1458.2
7		[M+H] ⁺ 1568.0	[M+Na] ⁺ 1590.1
8		[M+H] ⁺ 1582.0	[M+Na] ⁺ 1604.5
9		[M+H] ⁺ 1639.0	[M+Na] ⁺ 1661.2
10		[M+2Na] ²⁺ 878.9	[M+Na] ⁺ 1736.5
11		[M+2Na] ²⁺ 902.8	[M+Na] ⁺ 1782.4
12		[M+2Na] ²⁺ 923.2	[M+Na] ⁺ 1823.4
13		[M+2Na] ²⁺ 1002.8	[M+Na] ⁺ 1983.2
14		[M+2Na] ²⁺ 1062.2	[M+Na] ⁺ 2101.4
15		[M+2Na] ²⁺ 1069.2	[M+Na] ⁺ 2115.5
16		[M+2Na] ²⁺ 1076.3	[M+Na] ⁺ 2129.5

Установено бе, че повечето гликани имат общ конструктивен елемент - една (α 1-6) Fuc, свързана към GlcNAc-остатък от пентазахаридната сърцевина. Някои от структурите са частично модифицирани с метилова група на крайния хексозен остатък. При някои гликани е установено наличие на втори или трети Fuc остатък, включен в Fuc(α 1-3)GlcNAc мотив на въглехидратната верига.

Използвайки, изложената стратегия за анализ на гликопротеини бе определена въглехидратна структура на хемоцианин от *R. venosa*, като в структурните субеденици RvH1 и RvH2 бе установено наличието на високо хетерогенни смеси от гликани с различен състав - Hex0-9 HexNAc2-4 Hex0-3 Pent0-3 Fuc0-3. Чрез използване на представените маспектрометрични методи и техники бяха определени въглехидратни структури от високоманозен и комплексен вид на 25 гликани, изолирани от RvH1 и 28 гликани от RvH2, като и бяха установени центровете на гликозилиране. Това е достижение с фундаментално значение, тъй като разширява познанията относно многообразието на N-гликанови структури на хемоцианини от молюски, също и с практическо приложение, свързано с бъдещи изследвания на гликаните за диагностика и/или терапия.

Насока за бъдещи изследвания

Ще продължат изследванията върху въглехидратната структура на гликопротеини - хемоциани, изолирани от молюски (*Helix lucorum*) и артроподи (*Cancer Pagur*).

Друга тема, която ще се разработи е:

Изолиране и охарактеризиране на антимикробни пептиди от хемолимфата на молюски и артроподи

Актуалност на изследването

Един от сериозните проблеми за съвременната медицина е появата на все по-голям брой бактерии, резистентни към конвенционалните антибиотици. От друга страна се наблюдава и увеличаване на алергичните реакции и странични ефекти при пациентите. Ето защо вниманието на учените е насочено към търсене на алтернатива за преодоляването на тези проблеми и разработване на нови лекарствени препарати с нов механизъм на действие. През последните две десетилетия са изолирани и изследвани голяма група пептиди и полипептиди от различни организми с висока физиологична активност, нар. биологично активни пептиди, към тях се включват и пептидите с антимикробна активност. Антимикробните пептиди обикновено имат по-широк спектър на антибактериално

действие и освен това проявяват активност и срещу филаментозни гъбични инфекции, вирусни инфекции, протезойни и метазойни паразити. Някои АМ пептиди показват активност дори срещу щамове на бактерии, устойчиви на антибиотици. Тези пептиди са отлични възможност за развитие за нови терапевтични средства и добавки към конвенционалната терапия с антибиотици. Изследванията на някои от естествено срещаните пептиди и техните производни показват, че те могат да се използват като нови антиинфекциозни терапии при различни заболявания, като орален мукозит, белодробни инфекции свързани с фиброза кистоза, рак, и кожни инфекции. Установено е, че антимикробният пептид Pexiganan е ефективен при лечение на диабетични язви на краката. Ето защо, антимикробните пептиди са нова алтернатива на синтетичните антибиотици, с обещаващо бъдеще за приложение във фармацията и биотехнологията и се наричат “природни антибиотици”.

Същност на антимикробни пептиди (АМП-ди)

Пептидите са изградени от α -аминокиселинни остатъци, свързани във верига чрез пептидни (амидни) връзки. В живите клетки пептидите се синтезират от аминокиселини или се образуват от разграждане на протеините. Пептидите за разлика от протеините не губят своята биологична активност при висока температура, екстремни стойности на рН, високо налягане, разтваряне в органични разтворители, денатуриращи за повечето белтъци. Друга особеност на пептидите е, че много от тях съдържат необичайни аминокиселинни остатъци, рядко срещани в природата и не влизащи в състава на протеините.

Пептидите с висока физиологична активност, регулират различни биологични процеси и се наричат биологично активни пептиди. Те могат да се разделят в няколко групи:

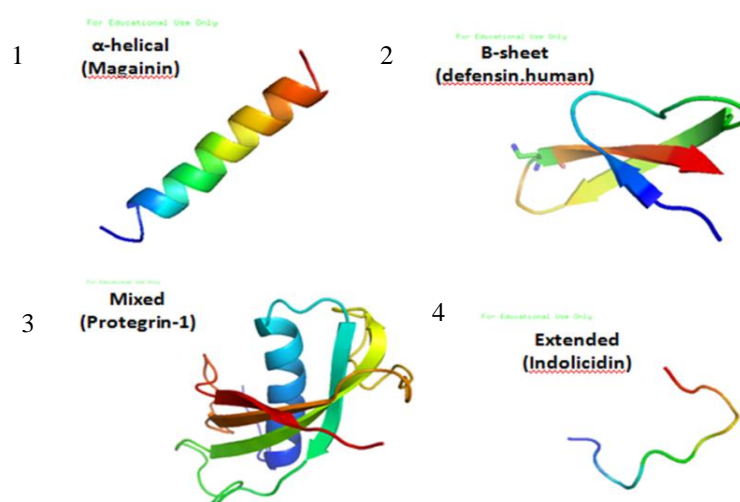
- Пептидни хормони: изключитено разнообразни по състав с хормоналната активност (глюкагон, окситоцин, вазопресин и т.н.);
- Невропептиди: действат върху централната нервна система, като регулират биохимичните процеси, свързани с механизмите на паметта, обучението, влияят върху контрола на съня, появата на чувство на страх, гняв, имат аналгетични свойства., ученето, и т.н.;
- Пептидни биорегулатори: пептиди с тъканно-специфично действие, могат да възстановят оптималното ниво на обмяната на веществата в клетките на организмите
- Антимикробни пептиди

Това разделение е условно, тъй като действието на много от пептидите не се ограничава в една област.

Обща характеристика на антимикробни пептиди

Антимикробните пептиди (АМП-ди) са уникална и разнообразна група от молекули, които могат да бъдат разпределени в подгрупи на базата на изграждащите ги АК остатъци и вторична структурата. АМП-ди обикновено са изградени от 12 и 50 аминокиселинни остатъци. Структурата и аминокиселинната последователност в антимикробни пептиди варира значително, но те имат и редица общи черти. Тези еволюционно запазени пептиди обикновено са положително заредени и пептидната им верига има хидрофобна и хидрофилна страна, което позволява на молекулата да бъде разтворима във водна среда, но също така да взаимодейства с богати на липиди мембрани. Най-общо, пептидната верига на АМП-ди включва два или повече положително заредени АК остатъци в кисела среда и неутрална среда, като аргинин, лизин или хистидин, и голям брой хидрофобни остатъци (обикновено над 50%). Вторичните структури на тези молекули могат да се обобщят в четири основни класа (Фиг. 43):

1. α -спирална структура;
2. β -лист структура, стабилизира чрез две или три дисулфидни връзки
3. смесена структура съдържаща α -спирала и β -лист структури, стабилизирани чрез една дисулфидна връзка и/или кристализация на пептидна верига;
4. разгъната линейна структура.



Фиг. 43. Основни вторични структури при АМП-ди.

Катйоните хидрофобни свойства на АМП-ди подпомагат тяхната селективност, тъй като повърхността на бактериалните мембрани е по-отрицателно заредена в сравнение с клетките на бозайниците и растенията. АМП-ди убиват

микроорганизмите без да причинят значителна токсичност за клетките на бозайниците. Установената селективност на АМП-ди гарантира тяхното приложение като антибиотици.

Антимикробните пептиди действат, както на грам-отрицателни и така и на грам-положителни бактерии, а също и на гъбички, вируси и протозои. Освен това АМ пептиди показват антимикробна активност дори срещу щамове на бактерии, устойчиви на антибиотици .

АМП-ди са важни компоненти на неспецифичната имунна система при различните организми от растения, насекоми, молюски и артроподи, земноводни и бозайници.

Освен, че убиват директно бактериите АМП-ди имат и някои имуномодулиращи функции, включително способността да променят генната експресия на гостоприемника. Те действат като хемокини и/или индуцират продуцирането на хемокини, инхибират липополизахариди включително продуцирането на про- противовъзпалителни цитокини, подпомагат заздравяването на раните и модулират имунните отговори на дендритни клетки и клетки на адаптивния имуноен отговор. Животински модели показват, че пептиди са от решаващо значение за защитата и изчистването на организма от инфекции. Изглежда, че много пептиди първоначално се изолираи и определят като "антимикробни пептиди" са показали, че имат много по-значими алтернативни функции *in vivo* (например *hepcidin*).

Състояние на изследванията

Голям брой АМП-ди са изолирани от животински и растителни организми. Пептиди богати на цистеин са изолирани от скорпион *Centruroides limpidus*, пептиди богати на пролин (*apidaecins* и *abeaecis*) са изолирани от насекомото *Hymenoptera*, *drosocin* от хемолимфата на *Drosophila* седем различни АМ пептиди от хемолимфата на *Drosophila melanogaster*, и т.н. Нов АМ пептид *temporin-SHf* е изолиран от кожата на жаба *Pelophylax saharica*. Той е най-малкия природен пептид открит до момента само с 8 аминокиселинни остатъка и има най-високото процентно съдържание на фенилаланинови остатъци, в сравнение с който и да е друг пептид или протеин до момента. Той е най-малкия природен пептид открит до момента само с 8 аминокиселинни остатъка (F-F-F-L-S-R-I-F) и има най-високото процентно съдържание на фенилаланинови остатъци, в сравнение с който и да е друг пептид или протеин до момента и е силно хидрофобен. Освен късата си

пептидна верига и хидрофобните си свойства, този пептид има много широк спектър на антимикробно действие срещу грам (+) и грам (-) бактерии и дрожди.

В хемолимфата на моллюските и артроподните организми, освен хемоцианин се съдържат и нискомолекулни съединения, като пептиди, гликопептиди, липиди, гликани и др. Пептиди с висока антибактериална активност срещу грам (-) бактерии са изолирани от хемолимфата на синия рак *Callinectes sapidus*, мангровия рак *Scylla serrata* и рака плувец *Thalamita crenata*. Установено е, че изолираните пептиди от синята мида *Mytilus edulis* са богати на цистеин и проявяват антимикробна активност срещу бактериите *Micrococcus luteus* и *E. coli*, както и противогъбично действие срещу *Neurospora crassa*. *Изолирането на пептиди с антибактериално и антигъбично действие е средоточено главно върху средиземноморската мида *Mytilus galloprovincialis* и *Mytilus galloprovincialis* и гастропода морския заек *Aplysia kurodai*. Поради широкия си спектър антимикробна активност пептидите от молюски и артроподни организми имат потенциал на приложение за лечение на рак, вирусни или паразитни инфекции,*

Освен раликите в структурата и размера на пептидните вериги АМП-ди се различават по тяхната катионна и хидрофобна природа, което се оказва от особена важност за взаимодействието между пептида и бактериалната мембрана. Пептидите богати на АК остатък цистеин изолирани от бозайници, насекоми и растения могат да служат като ефекторни молекули на първичния имунен отговор, осигурявайки достатъчна защита срещу инфекциозни паразити. Широкият спектър антимикробна активност на пептидите предполага че те могат да имат потенциален ефект при лечение на ракови заболявания, вирусни и паразитни инфекции.ето защо изолирането и определянето на първичната структура на тези съединения е много важно и би могло да намери приложение във фармацевтичната индустрия.

РАБОТНА МЕТОДИКА

1. Събиране на хемолимфа от молюски и/или артроподни организми. Центрифугиране с цел отстраняване на клетъчните компоненти.
2. Фракциониране на супернатанта от хемолимфата. Супернатанта ще бъде разделена на няколко фракции с помощта на ултрафилтрация, чрез филтри с различен размер на порите.Концентриране.

3. Тестване на всяка от фракциите за антимикробна активност срещу различни бактерии, като: *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* и др.
4. Изолиране на биоактивни компоненти от фракциите чрез хроматографски техники - обратно фазова високоефективна течна хроматография (RP-HPLC) на колона Nucleosil R C18, с буфер А (0.1% трифлуороцетна киселина-TFA) и буфер В (80% ацетонитрил, 0.08% TFA), със стъпаловиден градиент на буфер В (80% ацетонитрил, с 0.08% TFA), в три стъпки с 20, 50 и 80% буфер В.
5. 15% SDS-полиакриламидна гел електрофореза (следене чистотата на изолираните фракции)
6. Рехроматография чрез RP-HPLC. Рехроматографията на някои фракции ще бъде проведена с линеен градиент от 5% А (0.1% TFA във вода) до 100% В (0.085% TFA в ацетонитрил).
7. Тест за гликопептиди орцинол/ H_2SO_4 . Всеки пептид се накапва на силикагелна плочка и се изсушава. Плаката се напръсква с орцинол/ H_2SO_4 и се нагрява за 20 минути при 100 °C.
8. Тестване на всяка от фракциите за антимикробна активност срещу различни бактерии, като: *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* и др.
9. Определяне на точната молекулна маса чрез масспектрометричен анализ MALDI-TOF MS.
10. Определяне на N-крайните аминокиселинни последователности (АКП) чрез Едманово разграждане
11. Идентифициране на активните фракции под 10 000 Да - определяне на АКП чрез тандем масспектрометрия MALDI-TOF MS/MS и/или nano-LC-MS/MS Q-Trap система.
12. Сравняване на определените АКП с пептиди от други източници в база данни (MASCOT и др.)
13. Определяне на гликопептиди:
 - ✓ nano-LC-MS/MS Q-Trap система определяне на центъра на гликозилиране, АКП и въглехидратната верига;
 - ✓ определяне на въглехидратната верига след дегликозилиране чрез Q-Trap система.