

Исследование ион-молекулярных комплексов *бета*-циклодекстрина с белками и металлами в газовой фазе

Ю. И. Костюкевич,^{a,b,c,d} А. С. Кононихин,^{b,c,d} А. Е. Бутрова,^c Н. Л. Стародубцева,^b
И. А. Попов,^{c,d} Е. Н. Николаев

^aАвтономная некоммерческая образовательная организация высшего профессионального образования «Сколковский институт науки и технологий», 143025 Сколково, Московская обл, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л.Тальрозе Российской академии наук, 119334 Москва, Россия

^cФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, 119334 Москва, Россия

^dФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)», 141700 Долгопрудный, Московская обл., Россия

@E-mail: yura542@gmail.com

Показано, что температура десольватирующего капилляра источника ионизации электроспрей существенным образом влияет на процесс образования комплексов циклических олигосахаридов с белками и металлами. При повышении температуры комплексы с белками разрушаются, в то время как с металлами образуются сложные комплексы, состоящие из нескольких атомов металла и нескольких молекул сахара. Также в работе впервые были зарегистрированы комплексы олигосахаридов с катионами металлов в высоких степенях окисления (Th^{4+}), а также нековалентные комплексы ДНК-праймеров с несколькими молекулами β -циклодекстрина.

Ключевые слова: β -Циклодекстрин, электроспрей, масс-спектрометрия.

Investigation of Ion-Molecular Complexes of *beta*-Cyclodextrin with Proteins and Metals in Gas Phase

Yury I. Kostyukevich,^{a,b,c,d} Alexey S. Kononikhin,^{b,d} Anna E. Bugrova,^c
Natalia L. Starodubtzeva,^b Igor Popov^{c,d} and Eugene Nikolaev^{a,b,c,d}

^aSkolkovo Institute of Science and Technology, 143025 Skolkovo, Russian Federation

^bInstitute for Energy Problems of Chemical Physics Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

^cEmanuel Institute for Biochemical Physics Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

^dMoscow Institute of Physics and Technology, 141700 Dolgoprudnyi, Moscow Region, Russia

@Corresponding author E-mail: yura542@gmail.com

It is shown that the temperature of the desolvating capillary of the electrospray ionization source has a significant impact on the formation of complexes of cyclic oligosaccharides with proteins and metals. The complexes with proteins undergo decomposition upon temperature rise. Simultaneously complexes with metals consisting of several metal atoms and a few molecules of sugar appear. Besides novel oligosaccharides complexes with cations of metals in high oxidation states (Th^{4+}) and noncovalent complexes of DNA primers with several molecules of β -cyclodextrin have been obtained.

Keywords: *beta*-Cyclodextrin, electrospray, mass-spectrometry.

Введение

β -циклодекстрин это циклический олигосахарид, состоящий из 7 остатков глюкопиранозы. Структура его молекулы имеет вид сужающегося тора, при этом 7 основных и 14 вторичных гидроксильных групп расположены на узком и широком основаниях соответственно. Таким образом, внешняя поверхность циклодекстрина является гидрофильной, а внутренняя область оказывается способной к гидрофобному взаимодействию с широким классом молекул и образованию комплексов включения.^[1] Известно, что циклодекстрины образуют комплексы с большим числом молекул, содержащих фенильные или другие схожие по размерам ароматические группы. Многочисленные исследования подтвердили факт нековалентного присоединения β -циклодекстрина к белкам и пептидам через образование комплексов включения с аминокислотами, содержащими ароматические группы, особенно, с фенилаланином, тирозином и трипрофаном.^[2] При этом, закрытие гидрофобных участков белков гидрофильным олигосахаридом приводит к существенно увеличению растворимости белка.^[3]

Масс-спектрометрия в сочетании с мягкими методами ионизации, такими как электроспрей (ESI), лазерная десорбция/ионизация из матрицы (MALDI) и т.д., является эффективным методом исследования широкого класса различных нековалентных комплексов.^[4,5] С помощью масс-спектрометрии были изучены кластеры воды, комплексы пептидов и белков с металлами, сахарами, органическими красителями.^[6] Масс-спектрометрия также позволяет исследовать комплексы нуклеиновых кислот как друг с другом, так и с другими молекулами (белками, танинами, металлами и т.д.).^[7] Однако, в отличие от других методов, которые дают информацию о комплексах в их естественных условиях, в масс-спектрометрических исследованиях объектом исследования является ион в газовой фазе, при этом сам процесс образования заряженного иона из раствора может существенно образом влиять на исследуемое вещество,^[2] что особенно важно учитывать при исследовании слабо связанных нековалентных комплексов.^[8]

Одним из самых распространенных методов мягкой ионизации органических молекул является метод электроспрея, состоящий в пропускании раствора исследуемого образца через полую металлическую иглу, на которую подается электрический потенциал порядка 4 кВ. С конца иглы эмитируются заряженные капли, которые испаряются в нагреваемом (до 200–400 °С) капилляре. В результате испарения и кулоновского дробления капля образуются молекулярные ионы в газовой фазе. Ранее нами было показано, что при увеличении температуры испарения капля может наблюдаться явление «суперметаллизации» белков и пептидов,^[9] которое заключается в формировании в газовой фазе комплексов $[M+(z-kn)H+nX]^{z+}$, содержащих аномально большое количество атомов металла. Здесь M – молекула белка, X – ион металла, n – количество ионов металла, k – валентность металла, z – заряд комплекса. Например, для пептида β -амилоида (участок 1-16) было показано, что 2-зарядный ион пептида может присоединить к себе до 11 атомов цинка, причем присоединение каждого атома

цинка сопровождается потерей двух атомов водорода. Также было обнаружено, что температура среды, в которой испаряются заряженные капли, существенным образом влияет на протекание различных ион-молекулярных реакций, одним из примеров таких реакций является реакция дейтеро/водородного обмена.

В настоящей статье предпринимается попытка изучить зависимость образования в результате ионизации электроспрей ионных комплексов β -циклодекстрина с белками и металлами в газовой фазе. Также, в настоящей работе, насколько нам известно, впервые демонстрируются ион/молекулярные комплексы циклодекстрина с металлами в высоких степенях окисления, а именно комплексы с $Ce(III)$ и $Th(IV)$. Также демонстрируются комплексы β -циклодекстрина с олигонуклеотидом.

Экспериментальная часть

Пробоподготовка. Убиквитин и β -циклодекстрин коммерческие продукты компании «Sigma» (U6253-25MG) и «Ledebur» соответственно. Для исследования использовались растворы с концентрацией β -циклодекстрина 2.5 мМ и убиквитина 0.1 мМ. Концентрации ионов церия (в виде ацетат церия(III)) и тория (нитрат тория(IV)) составляли 2.5 мМ. Растворитель – смесь вода:метанол (1:1) с добавлением 0.1 % муравьиной кислоты. Все используемые растворители соответствовали классу «особо чистый». ДНК-праймер коммерческий продукт компании «Евроген». Длина праймера 18 остатков, последовательность АТАТААААААСГСГСГ. Концентрация праймера была 0.2 мМ, растворитель вода:метанол (1:1) с добавлением ацетата аммония до концентрации 0.1 М.

Масс-спектрометрия. Все эксперименты были выполнены на приборе LTQ FT Ultra (Thermo Electron Corp., Бремен, Германия). Данный прибор является масс-спектрометром ионного циклотронного резонанса, он оснащен сверхпроводящим магнитом, создающим магнитное поле с индукцией 7 Т. Ионизация методом электроспрея осуществлялась с использованием штатного источника ионизации IonMax (Thermo Electron Corp., Бремен, Германия) в режиме образования положительных (эксперименты с белками и металлами) и отрицательных (эксперимент с олигонуклеотидом) ионов. Образующиеся заряженные капли засасываются в масс-спектрометр через тонкий нагреваемый капилляр. Температура капилляра варьировалась в пределах от 100 до 450 °С. Длина капилляра 105 мм и его внутренний диаметр 0.5 мм. Скорость напуска вещества в камеру ионизации была равна 1 мкл/мин, напряжение на игле источника ионизации равнялось 3 кВ.

Реакция дейтеро/водородного обмена в источнике ионизации. Для создания в источнике ионизации атмосферы, насыщенной парами дейтерированного растворителя 400 мкл D_2O размещалось на медной подложке, расположенной на расстоянии около 7 мм под иглой источника ионизации. Из-за испарения капли в области образования газофазных ионов создается атмосфера, насыщенная парами D_2O . Игла источника ионизации электроспрей была расположена в 5 мм от входного отверстия нагреваемого капилляра.

Результаты и обсуждение

Молекула β -циклодекстрина, а также схема экспериментальной установки представлена на Рисунке 1. Заряженные капли проходят нагреваемый капилляр и испаряются, образуя ионы в газовой фазе. Изменение

температуры нагреваемого капилляра влияет на кинетику испарения капель и ион-молекулярных реакций. В результате этого состав продуктов ионизации существенным образом зависит от температуры.

Полученные в ходе экспериментов масс-спектры представлены на Рисунках 2–6. В частности, на Рисунке 2 приведены масс-спектры, отражающие образование комплексов β -циклодекстрина с небольшим белком убиквитин для различных температур капилляра. На Рисунке 3 представлено первое, насколько нам известно, наблюдение комплекса олигосахарида с тетравалентным металлом Th(IV). На Рисунке 4 приведены масс-спектры комплексов β -циклодекстрина с трехвалентным металлом Ce(III); на этом же рисунке показано изменение масс-спектра после проведения реакции дейтеро/водородно обмена в источнике ионизации. Наблюдение комплекса, отвечающего случаю одновременного присоединения β -циклодекстрина и Ce(III) к убиквитину, представлено на Рисунке 5. Также нами был получен комплекс β -циклодекстрина с олигонуклеотидом. Результат представлен на Рисунке 6.

При образовании комплексов β -циклодекстрина с белком убиквитин (Рисунок 2) видно, что при низких температурах капилляра в спектре преобладает ион $[CD+H_2O]^+$, здесь CD означает β -циклодекстрин. При увеличении температуры увеличивается интенсивность пиков, соответствующих молекулярным ионам комплекса убиквитина с β -циклодекстрином. При этом такие ионы наблюдаются для различных зарядовых состояний: $[M+CD+7H]^+$, $[M+CD+6H]^+$. При дальнейшем увеличении температуры капилляра интенсивность комплексов уменьшается, и для температуры 400 °C в спектре преобладают пики, соответствующие различным зарядовым состояниям убиквитина. Разрушение комплекса белка с β -циклодекстрином при повышенных температурах согласуется с представлениями об образовании слабо связанного нековалентного комплекса. Также отметим, что фрагментация комплекса, индуцированная столкновением с нейтральным газом (CID), не позволяет локали-

зовать область присоединения сахара, поскольку единственным путем фрагментации является отщепление молекулы β -циклодекстрина (Рисунок 2).^[10]

Ранее ряд работ был посвящен исследованию комплексов олигосахаридов с моно- и бивалентными металлами.^[11] На Рисунке 3 представлено первое, насколько нам известно, наблюдение комплекса олигосахарида с тетравалентным металлом Th(IV). Для введения ионов Th⁴⁺ в раствор использовался Th(NO₃)₄. Заметим, что при низких температурах в спектре доминируют ионы $[CD+H]^+$ и $[CD+H_2O]^+$. При увеличении температуры β -циклодекстрину становится более выгодно ионизироваться, присоединяя не протон, а катион Th⁴⁺, при этом отметим, что присоединение тория сопровождается потерей четырех атомов водорода, что свидетельствует о ковалентном, а не о координационном взаимодействии металла и сахара. Обратим внимание, что при повышенных температурах удается наблюдать образование таких сложных ионов, как $[2CD+Th-2H]^{2+}$, $[3CD+2Th-5H]^{3+}$, $[4CD+2Th-5H]^{3+}$, $[6CD+3Th-8H]^{4+}$. Точное установление элементного состава возможно благодаря использованию масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса сверхвысокого разрешения. В наших экспериментах достигалась разрешающая способность порядка 400 000 Да. Также отметим образование комплекса, когда, по всей видимости, у атома Th(IV) сохраняется одна нитрогруппа: $[CD+Th+NO_3-2H]^+$.

На Рисунке 4 приведены масс-спектры комплексов β -циклодекстрина с трехвалентным металлом Ce(III). Состав комплексных ионов оказался более бедным, чем при образовании комплексов с Th⁴⁺, удалось наблюдать ионы $[CD+Ce-2H]^+$, $[3CD+3Ce-7H]^{2+}$, $[CD+Ce-2H]^+$, $[4CD+2Ce-4H]^{2+}$. Обратим внимание, что, как и для случая с Th⁴⁺, присоединение Ce³⁺ сопровождается потерей трех атомов водорода. Также на Рисунке 4 представлены масс-спектры CID фрагментации для ионов $[CD+Ce-2H]^+$ и $[CD+2Ce-5H]^+$. Известно, что для циклических олигосахаридов преобладают два канала фрагментации: отщепление фрагмента с массой 162 и отщепление фрагмента с массой 264

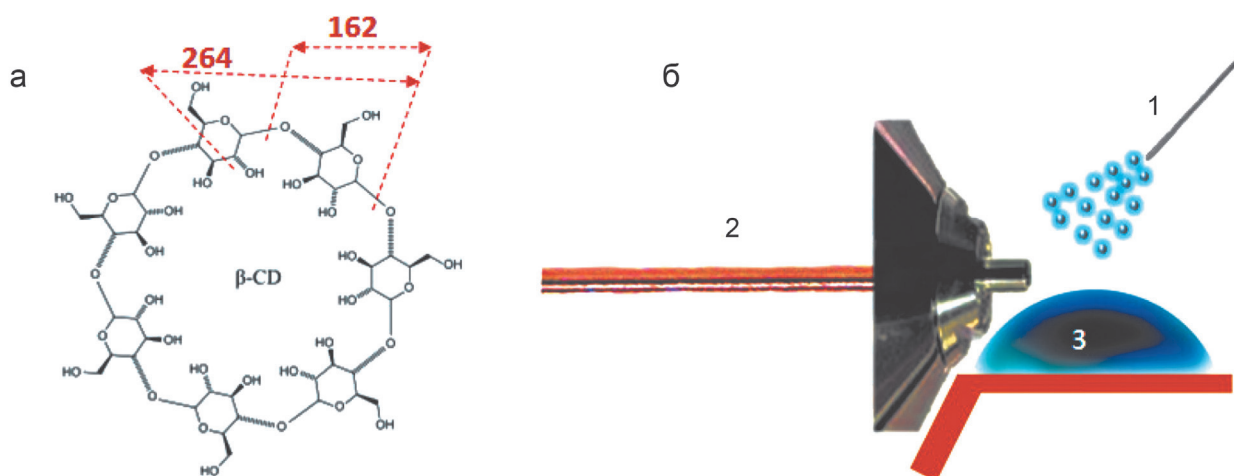


Рисунок 1. а – Структура молекулы β -циклодекстрина и области, в которых происходит разрыв связей при CID фрагментации. б – Схема источника ионизации электроспрей: 1 – полая игла, находящаяся под потенциалом 3 кВ, 2 – нагреваемый капилляр, 3 – 400 мкл D₂O для проведения реакции дейтеро-водородного обмена в источнике, в остальных экспериментах не использовалось.

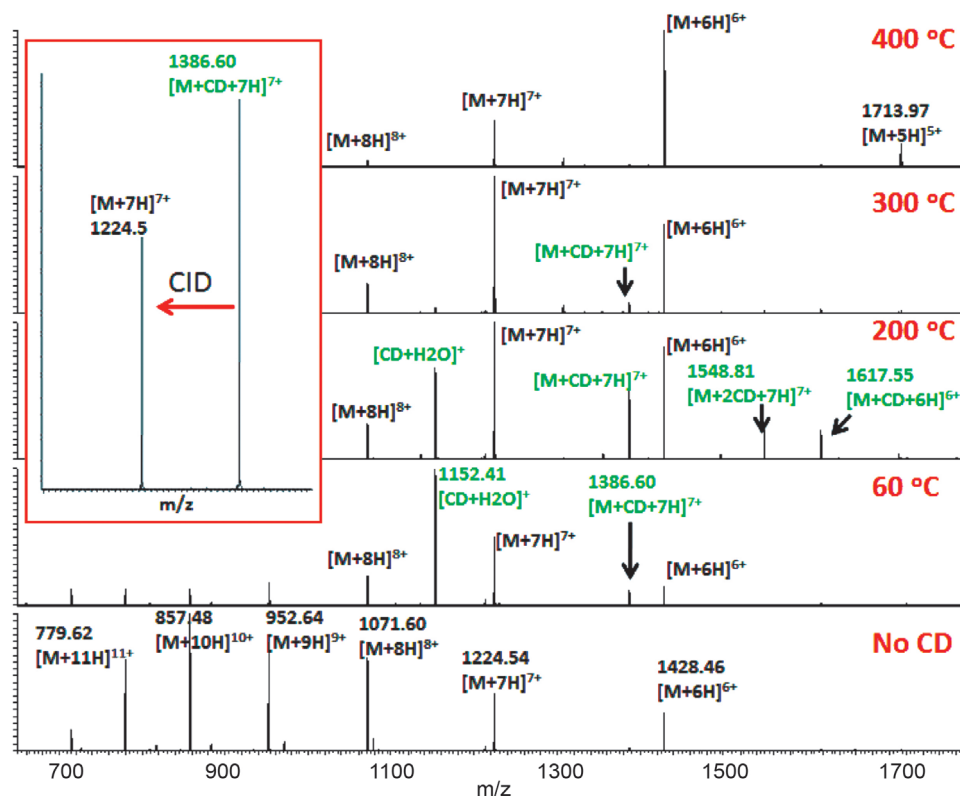


Рисунок 2. Наблюдение комплексов β -циклодекстрина с убиквитином. В нижней части рисунка показан спектр убиквитина без добавления β -циклодекстрина. В остальных частях рисунка показаны спектры убиквитина при добавлении β -циклодекстрина для различных температур десольватирующего капилляра. На вставке приведен спектр столкновительной фрагментации комплекса убиквитина с β -циклодекстрином. Концентрация убиквитина 0.1 mM, β -циклодекстрина 2.5 mM, растворитель вода:метанол (1:1) с добавлением 0.1% муравьиной кислоты. Здесь М – убиквитин, CD – β -циклодекстрин.

(Рисунок 1).^[12] Как видно, при фрагментации комплекса β -циклодекстрина с различным количеством атомов цезия наблюдается отщепление таких же фрагментов. Ион металла в результате фрагментации не теряется.

Для дополнительного исследования комплексов β -циклодекстрина с Ce^{3+} нами была проведена реакция дейтеро/водородного обмена в источнике ионизации. Данная реакция позволяет делать определенные выводы о структуре и о конформации ионов в газовой фазе. Ранее методика проведения реакции дейтеро/водородного обмена в газовой фазе при атмосферном давлении прямо во время процесса ионизации^[13] была успешно применена для структурного исследования широкого класса различных соединений, таких как пептиды,^[14,15] белки, сахара,^[16,17] малые органические молекулы,^[18–22] сложные природные субстанции^[23,24] и олигонуклеотиды.^[25]

Результаты анализа реакции дейтеро/водородного обмена для комплексов β -циклодекстрина с Ce^{3+} приведены в Таблице 1. Можно видеть, что при увеличении размера комплекса количество обменов водорода на дейтерий уменьшается, что может свидетельствовать о том, что атомы водорода в области присоединения молекул β -циклодекстрина друг к другу оказываются более труднодоступными.

Также нами была предпринята попытка изучить образование комплекса белка одновременно с метал-

Таблица 1. Количество замен атомов водорода на дейтерий при проведении реакции дейтеро/водородного обмена в источнике ионизации (Рисунок 4).

Ион	m/z	m/z (H/D)	% H/D
$[CD+H_2O]^+$	1157.37	1172.47	69
$[3CD+3Ce-7H]^{2+}$	1340.72	1353.81	47
$[CD+Ce-2H]^+$	1409.16	1422.25	69
$[4CD+Ce-1H]^{2+}$	1771.56	1795.53	58
$[4CD+2Ce-4H]^{2+}$	1840.47	1861.33	52
$[4CD+3Ce-7H]^{2+}$	1908.93	1929.60	54

лом и β -циклодекстрином. Наблюдение такого комплекса для случая одновременного присоединения β -циклодекстрина и Ce^{3+} к убиквиту представлено на Рисунке 5. Для различных зарядовых состояний были обнаружены комплексы, образующиеся в результате присоединения нескольких атомов $Ce(III)$, а также комплексы, образующиеся в результате присоединения нескольких атомов $Ce(III)$ и одной молекулы β -циклодекстрина. Как и ранее, заметим, что эффективность образования комплексов зависит от температуры десольватирующего капилляра. Также отметим тот факт, что при увеличении температуры металл связывается предпочтительно с β -циклодекстрином, а не с убиквитином.

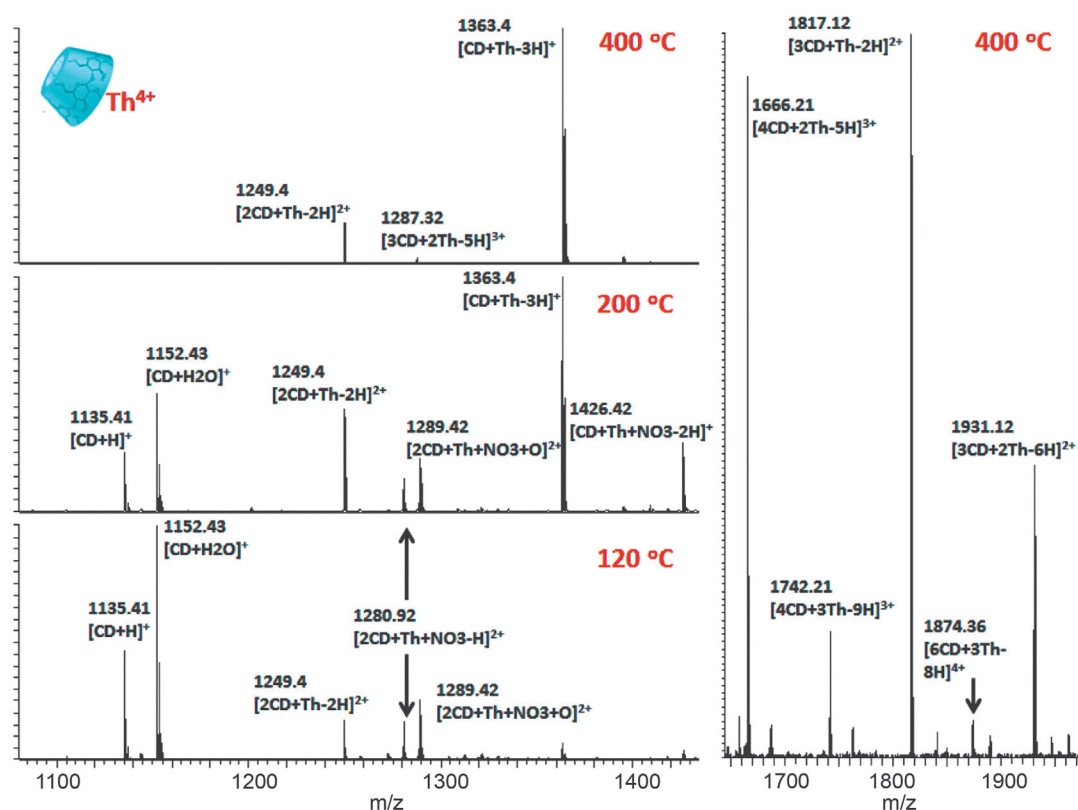


Рисунок 3. Наблюдение комплексов β -циклодекстрина с Th^{4+} . Показана зависимость вида масс-спектра от температуры. Для $T=400\text{ }^{\circ}\text{C}$ показаны различные массовые диапазоны. Концентрация β -циклодекстрина 2.5 mM, концентрация ионов Th^{4+} 2.5 mM, растворитель вода:метанол (1:1) с добавлением 0.1 % муравьиной кислоты.

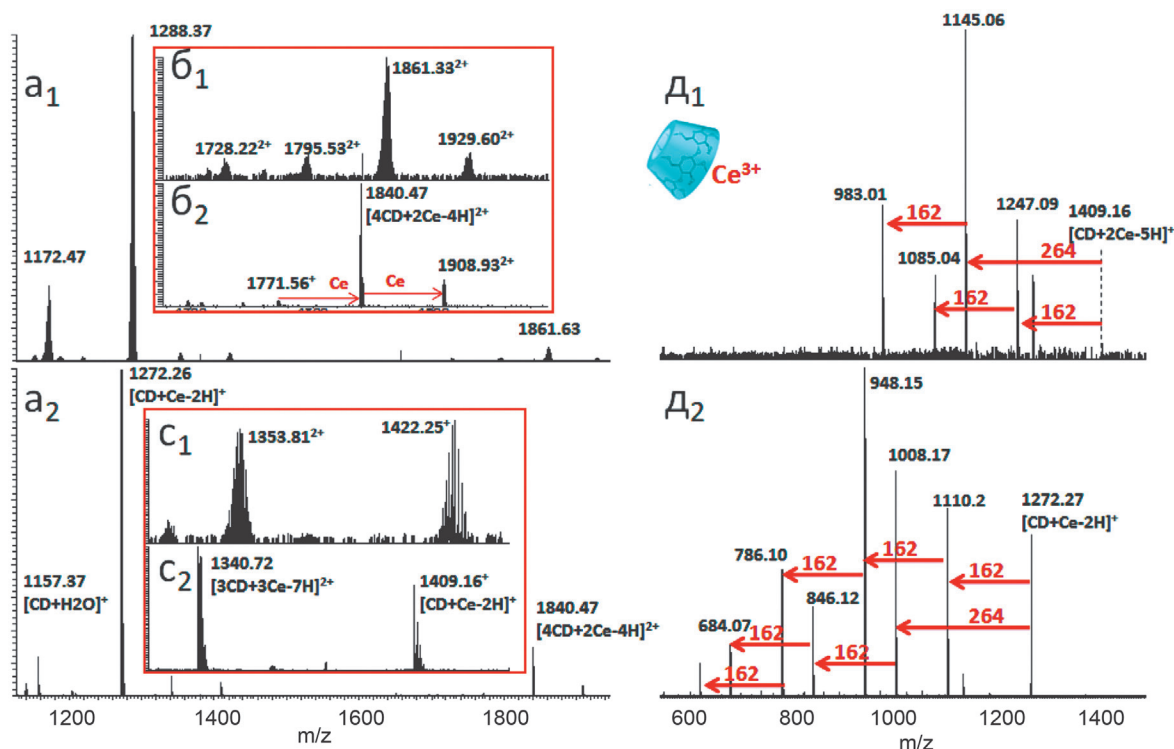


Рисунок 4. Наблюдение комплексов β -циклодекстрина с Ce^{3+} . Приведены участки масс-спектра различного массового диапазона; a_1 , b_1 , c_1 – после реакции дейтеро/водородного обмена в источнике ионизации; a_2 , b_2 , c_2 – без проведения реакции дейтеро/водородного обмена; d_1 – столкновительная фрагментация комплекса $[\text{CD}+2\text{Ce}-5\text{H}]^+$; d_2 – столкновительная фрагментация комплекса $[\text{CD}+\text{Ce}-2\text{H}]^+$. Концентрация β -циклодекстрина 2.5 mM, концентрация ионов Ce^{3+} 2.5 mM, растворитель вода:метанол (1:1) с добавлением 0.1 % муравьиной кислоты. $T=450\text{ }^{\circ}\text{C}$.

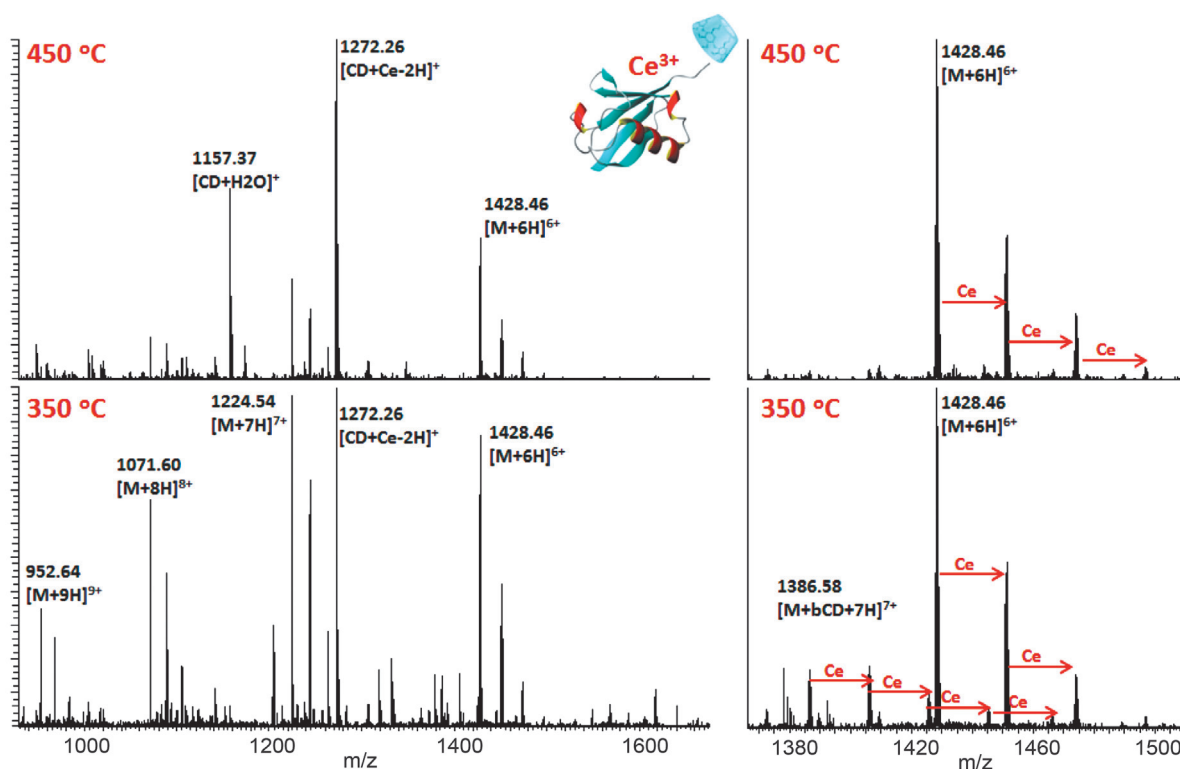


Рисунок 5. Образование комплексов убиквитина одновременно с Ce^{3+} и с β -циклодекстрином для различных температур десольватурующего капилляра. Концентрация убиквитина 0.1 мМ, β -циклодекстрина 2.5 мМ, концентрация ионов Th^{4+} 2.5 мМ, растворитель вода:метанол (1:1) с добавлением 0.1 % муравьиной кислоты.

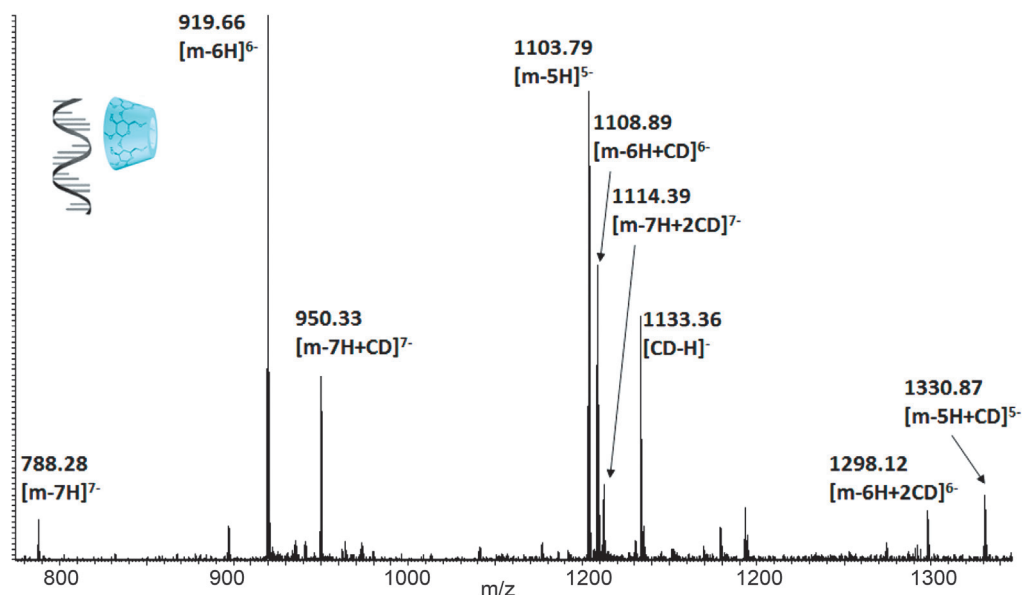


Рисунок 6. Образование комплекса олигонуклеотида с β -циклодекстрином.

На Рисунке 6 представлено получение нековалентного комплекса β -циклодекстрина и короткого ДНК-праймера (олигонуклеотида). Обнаружено присоединение до двух молекул CD к праймеру длиной 18 нуклеотидов. При исследовании данного комплекса существенных зависимостей от температуры выявлено не было.

Заключение

В работе была продемонстрирована возможность наблюдения широкого класса комплексов циклического олигосахарида с металлами, белками и олигонуклеотидами методами масс-спектрометрии в сочетании с ионизацией методом электроспрей. Также были

изучены особенности образования данных комплексов в зависимости от условий эксперимента. Показано, что комплексы β -циклодекстрина с белками и олигонуклеотидами являются достаточно стабильными в широком диапазоне температур и разрушаются только при температуре капилляра более 400 °С. Комплексы β -циклодекстрина с металлами, наоборот, плохо образуются при низких температурах, и для их наблюдения требуется увеличивать температуру капилляра до значений порядка 300 °С. Таким образом, показана роль параметров источника ионизации в экспериментах по исследованию нековалентных комплексов. Полученные результаты будут иметь большое значение при применении масс-спектрометрии для исследования реальных биологических образцов, поскольку они демонстрируют ограничения метода и позволяют избежать ошибочной интерпретации данных.

Благодарности. Разработка ионного источника была выполнена при поддержке грантов РФФИ 16-38-60153 мол_а_дк и 15-08-09364 а. Работа по идентификации и анализу белковых комплексов проводилась в рамках проекта РНФ 16-14-00181. Для масс-спектрометрического анализа проб использовалось оборудование ЦКП ИБХФ РАН «Новые материалы и технологии».

References

Список литературы

1. Camilleri P., Haskins N.J., New A.P., Saunders M.R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7, 949–952.
2. Ahn S., Cong X., Lebrilla C.B. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, 16, 166–175.
3. Camilleri P., Haskins N.J., Howlett D.R. *Febs Letters* **1994**, 341, 256–258.
4. Pramanik B.N., Bartner P.L., Mirza U.A., Liu Y.H., Ganguly A.K. *J. Mass Spectrom.* **1998**, 33, 911–920.
5. Loo J.A. *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, 16, 1–23.
6. Allardyce C.S., Dyson P.J., Coffey J., Johnson N. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, 16, 933–935.
7. Beck J.L., Colgrave M.L., Ralph S.F., Sheil M.M. *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, 20, 61–87.
8. Lebrilla C.B. *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 653–661.
9. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Popov I., Indeykina M., Kozin S.A., Makarov A.A., Nikolaev E. *J. Mass Spectrom.* **2015**, 50, 1079–1087.
10. Qi Y.L., Geib T., Volmer D.A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2015**, 26, 1143–1149.
11. Cai Y., Tarr M.A., Xu G.X., Yalcin T., Cole R.B. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, 14, 449–459.
12. Franski R., Gierczyk B., Schroeder G., Beck S., Springer A., Linscheid M. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 1567–1572.
13. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Popov I., Nikolaev E. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 5330–5334.
14. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Popov I., Nikolaev E. *J. Mass Spectrom.* **2014**, 49, 989–994.
15. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Popov I., Spasskiy A., Nikolaev E. *J. Mass Spectrom.* **2015**, 50, 49–55.
16. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Popov I., Nikolaev E. *J. Mass Spectrom.* **2015**, 50, 1150–1156.
17. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Popov I., Nikolaev E. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 2595–2600.
18. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Popov I., Kharybin O., Perminova I., Konstantinov A., Nikolaev E. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 11007–11013.
19. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Zhrebker A., Popov I., Perminova I., Nikolaev E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 406, 6655–6664.
20. Zhrebker A.Y., Airapetyan D., Konstantinov A.I., Kostyukevich Y.I., Kononikhin A.S., Popov I.A., Zaitsev K.V., Nikolaev E.N., Perminova I.V. *Analyst* **2015**, 140, 4708–4719.
21. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Popov I., Nikolaev E. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2015**, 21, 109–113.
22. Kostyukevich Y., Kononikhina A., Popov I., Starodubtzeva N., Kukaev E., Nikolaev E. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2014**, 20, 345–349.
23. Kostyukevich Y., Zhrebker A., Kononikhin A., Popov I., Perminova I., Nikolaev E. *Int. J. Mass Spectrom.* **2016**, 404, 29–34.
24. Kostyukevich Y., Solovyov S., Kononikhin A., Popov I., Nikolaev E. *J. Mass Spectrom.* **2016**, 51, 430–436.
25. Kostyukevich Y., Kononikhin A., Popov I., Starodubtzeva N., Pekov S., Kukaev E., Indeykina M., Nikolaev E. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2015**, 21, 59–63.

Received 18.11.2016

Accepted 28.02.2017