

DOI 10.23946/2500-0764-2018-3-2-12-19

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ БИОНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК

ЮЖАЛИН А.Е.¹, ДЕМИДОВ Е.А.², ПЕЛЬТЕК С.Е.²

¹Кафедра онкологии, Оксфордский институт радиационной онкологии, Оксфордский университет, г. Оксфорд, Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии

²ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

ORIGINAL ARTICLE

MASS SPECTROMETRY OF PROTEINS EXTRACTED FROM PLAQUE-DERIVED CALCIUM PHOSPHATE BIONS

ARSENIY E. YUZHALIN¹, EVGENIY A. DEMIDOV², SERGEY E. PELTEK²

¹CRUK/MRC Oxford Institute for Radiation Oncology (Old Road Campus Research Building, Roosevelt Drive, Oxford OX3 7DQ), United Kingdom

²Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (10, Prospekt Lavrentyeva, Novosibirsk, 630090), Russian Federation

Резюме

Цель. Изучить белковый состав кальций-фосфатных бионов (КФБ), выделенных из атеросклеротических бляшек крупных артерий человека.

Материалы и методы. КФБ были выделены по оригинальному протоколу из атеросклеротических бляшек, полученных из бедренной артерии двух пациентов с ишемической болезнью сердца и гемодинамически значимым мультифокальным атеросклерозом. После разделения белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с целью проведения протеомного анализа были проведены триптический гидролиз белков и время-пролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация-масс-спектрометрия (МАЛДИ-ВП-МС). Спектры триптических гидролизатов отдельных белков идентифицировались при помощи поисковой системы Mascot.

Результаты. Было выявлено, что выделенные из атеросклеротических бляшек бедренной артерии человека КФБ содержат бычий и человеческий сывороточный альбумин, бычий альфа-2-макроглобулин, а также человеческий цитоплазматический актин 1. Таким образом, показано, что КФБ способны как адсорбировать белки из фетальной бычьей сыворотки в процессе культивирования, так и содержать в своем составе белки из атеросклеротических бляшек после их выделения.

Заключение. КФБ, выделенные из атеросклеротических бляшек крупных артерий человека, содержат в своем составе те же белки, что и искусственно синтезированные КФБ, однако адсорбируют не только белки сыворотки, но и белки бляшки.

Ключевые слова: кальций-фосфатные бионы, атеросклероз, бляшки, белковый состав, масс-спектрометрия, протеомика.

English ►

Abstract

Aim. To investigate the proteomic profile of calcium phosphate bions (CPB) derived from atherosclerotic plaques of large human arteries.

Materials and Methods. CPB were extracted from femoral atherosclerotic plaques of two patients with coronary artery disease and significant peripheral atherosclerosis utilizing an original pro-

tol. After sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, we performed tryptic hydrolysis followed by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Mass spectra were identified using the Mascot search engine.

Results. Plaque-derived CPB contained bovine and human serum albumin, bovine alpha-2-macroglobulin, and human cytoplasmic actin 1. Hence,

we showed that CPB adsorb proteins from both fetal bovine serum and atherosclerotic plaques.

Conclusion. Plaque-derived CPB have similar proteomic profile to artificially synthesized CPB, yet adsorbing plaque proteins in addition to those characteristic for the serum.

Keywords: calcium phosphate bions, atherosclerosis, plaques, proteomic profile, mass spectrometry, proteomics.

Введение

Кальций-фосфатные бионы (КФБ) представляют собой минерало-органические наночастицы диаметром от 80 до 500 нм, образующиеся в крови человека при перенасыщении ионами кальция и фосфора, оказывающие токсическое действие на эндотелиальные клетки и вызывающие развитие гипертрофии брюшной аорты крыс [1-3]. Детальное изучение патогенного действия КФБ требует подробной характеристики их химического состава, включая высокопроизводительные методы. В то время как минеральный профиль КФБ может быть изучен различными методами элементного анализа (к примеру, энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией и атомно-эмиссионной спектроскопией), инфракрасной спектроскопией и спектроскопией комбинационного рассеяния света с целью анализа функциональных групп и рентгеновской порошковой дифрактометрией для определения химической формулы входящих в их состав соединений, исследование органического профиля КФБ технически затруднительно вследствие малого содержания биомолекул. Предыдущие эксперименты показали, что выделенные из атеросклеротических бляшек КФБ имеют в своем составе остаточные липиды, в то время как искусственно синтезированные КФБ не содержат веществ липидной природы [3]. Это позволило предположить, что белковый профиль КФБ, выделенных из атеросклеротических бляшек, и искусственно синтезированных КФБ также может несколько отличаться. Как правило, с целью общей оценки белкового состава КФБ целесообразно применять электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, а для идентификации конкретных белков – иммуноблоттинг. В то же время для получения максимального количества данных о входящих в их состав белках необходимо проведение масс-спектрометрии, которая на текущем этапе развития науки явля-

ется наиболее высокопроизводительным методом протеомики [4, 5].

Цель исследования

Изучить белковый состав кальций-фосфатных бионов (КФБ), выделенных из атеросклеротических бляшек крупных артерий человека.

Материалы и методы

Выделение кальций-фосфатных бионов из атеросклеротических бляшек

Сегменты кальцифицированных атеросклеротических бляшек из бедренных артерий двух пациентов с ишемической болезнью сердца и мультифокальным атеросклерозом (гемодинамически значимым стенозом артерий нижних конечностей) были получены в результате хирургического вмешательства. Ткань гомогенизировали при помощи ступки и пестика, проводили ультразвуковую дезинтеграцию (UD-20, TechPan) в режиме наибольшей мощности и центрифугировали при 3,000 x g в течение 10 мин при 4°C (5804R, Eppendorf). Далее надосады фильтровали через целлюлозно-ацетатный фильтр (Millipore) с диаметром пор 0,22 мкм, после чего 3 мл фильтрата добавлялись во флакон (T-25, Greiner) с 7 мл модифицированной по Дульбекко среды Игла (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM), которая дополнительно содержала 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco), 1% раствор L-глутамин-пенициллина-стрептомицина (Gibco) и 0,4% раствор амфотерицина В (Gibco). Все процедуры осуществляли в стерильных условиях. Культивирование КФБ проводили при 37°C, 5% CO₂ и высокой влажности (MCO-18AIC, Sanyo) в течение 6 недель. В качестве отрицательного контроля использовали культуральную среду с добавлением и без добавления аналогичного количества однократного фосфатно-солевого буфера (pH 7.4, Gibco), а также чистую среду DMEM (без сыворотки и иных добавок). Для

подтверждения роли выделяемых из бляшки кальция и фосфора в формировании КФБ осуществляли такую же процедуру для тканей внутренней грудной артерии, которая практически никогда не поражается атеросклерозом (известны лишь единичные случаи в литературе). После 6 недель культивирования культуральную среду центрифугировали при 200,000 x g в течение 1 ч при 4°C (Optima MAX-XR, Beckman Coulter). Осадок растворяли в стерильной бидистиллированной воде, содержание КФБ в растворе определяли измерением оптической плотности (УНИПЛАН/АИФР-01, Пикон) на длине волны 650 нм (OP_{650}) и приводили все образцы к одной концентрации ($OP_{650} = 0,08-0,10$).

Разделение белков интактных кальций-фосфатных бионов

Образцы концентрировали на центрифужных концентраторах Vivaspin 2 (Sartorius) до объема 20 мкл. Для проведения электрофореза белков в мини-геле (8×10 см, толщина 1 мм) концентрированные образцы смешивали в соотношении 1:1 с буфером Лэммли (0,05М Трис-НСI pH 6,8; 2% додецилсульфат натрия; 0,002% бромфеноловый синий; 10% глицерин; 5% 2-меркаптоэтанол) и далее кипятили в течение 5 минут. В качестве маркера молекулярных масс использовали Precision Plus (Bio-Rad). На каждую дорожку наносили по 20 мкл образца, белки концентрировали в 4% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (акриламид/бисакриламид в соотношении 37,5:1, 0,1% додецилсульфат натрия, 0,125 мМ Трис-НСI pH 6,8, 0,1% тетраметилэтилендиамин, 0,05% персульфат аммония) при силе тока 15 мА на гель и разделяли в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (акриламид/бисакриламид в соотношении 37,5:1, 0,1% додецилсульфат натрия, 0,375 мМ Трис-НСI pH 8,8, 0,05% тетраметилэтилендиамин, 0,05% персульфат аммония) при силе тока 25 мА на гель в электрофоретической камере Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). Гели окрашивали флюоресцентным красителем Sypro Ruby (Molecular Probes), отмывали в 7% уксусной кислоте и 10% этаноле при комнатной температуре, промывали бидистиллированной водой и визуализировали при помощи геле-документирующей системы VersaDoc MP4000 (Bio-Rad). Фотографии гелей представлены на рисунке 1.

Масс-спектрометрия

Белковые фракции вырезали из гелей при помощи прибора EXQuest Spot Cutter (Bio-Rad) и переносили в пробирки. Триптический гидролиз белка был выполнен согласно следующему протоколу: кусочки гелей промывали 0,2М бикарбонатом аммония в 50% ацетонитриле при 37°C, затем высушивали 100% ацетонитрилом, добавляли 150 мкл 0,2М бикарбоната аммония и 20 мкл 0,045М дитиотреитола и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Далее гели снова сушили 100% ацетонитрилом и инкубировали в 0,1М йодацетамиде в темноте в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем гели высушивали 100% ацетонитрилом и проводили собственно триптический гидролиз белка путем регидратации геля раствором модифицированного свиного трипсина (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) с концентрацией 15 мкг/мл в 0,05М бикарбонате аммония. Гидролиз проводили в течение 17 ч при 37°C.

После проведения триптического гидролиза раствор отбирали в отдельные пробирки, к кусочкам геля добавляли 15 мкл раствора 70% ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой и далее инкубировали 2 часа на термощейкере (TS-100C, Biosan) при 37°C и 1000 об/мин. Далее надосадки сливали вместе и упаривали досуха на центрифужном вакуумном испарителе (Concentrator Plus, Eppendorf).

Для проведения масс-спектрометрического анализа методом времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации-масс-спектрометрии (МАЛДИ-ВП-МС) образцы растворялись в 12 мкл 5% ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой. Перед нанесением на мишень масс-спектрометра образцы концентрировались на микроколонках ZipTip C18 (Millipore) согласно протоколу производителя. В качестве матрицы использовался насыщенный раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (Fluka) в 70% ацетонитриле с 0,1% муравьиной кислотой. Спектры получали на приборе Solarix XR 7T (Bruker Daltonics). Спектры триптических гидролизатов отдельных белков идентифицировались при помощи поисковой системы Mascot.

Результаты

Разработанная оригинальная методика позволила выделить кальций-фосфатные бионы

Номер полосы Band number	Белок Protein	База данных Database	Молекулярная масса Molecular mass	Вид Type
1	Альфа-2-макроглобулин <i>Alpha-2-Macroglobulin</i>	swissProt	167470	<i>Bos taurus</i>
2	Альфа-2-макроглобулин <i>Alpha-2-Macroglobulin</i>	swissProt	167470	<i>Bos taurus</i>
3	Не идентифицирован <i>Not identified</i>			
4	Не идентифицирован <i>Not identified</i>			
5	Сывороточный альбумин <i>Serum albumin</i>	swissProt	69248	<i>Bos taurus</i>
6	Цитоплазматический актин 1 <i>Human cytoplasmic actin 1</i>	swissProt	41710	<i>Homo sapiens</i>
7	Не идентифицирован <i>Not identified</i>			
10	Не идентифицирован <i>Not identified</i>			

Таблица 1.

Идентификация белков по их триптической карте масс

Table 1.

Tryptic mass mapping analysis

из атеросклеротических бляшек, которые визуализировались как при макроскопическом обследовании, так и при измерении оптической плотности, после растворения в бидистиллированной воде придавая раствору ОП₆₅₀ в 0,08-0,10. При разделении белков методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием красителем Sypro Ruby в образцах КФБ от обоих пациентов было выявлено 10 полос, соответствующих различным бычьим или человеческим белкам (таблица 1, рисунок 1).

Идентификация белков после масс-спектрометрии показала, что молекулярные массы полос 1 и 2 соответствуют альфа-2-макроглобулину (167,5 кДа, рисунок 2, рисунок 3), полосы 5 – бычьему сывороточному альбумину (69 кДа, рисунок 4), а полосы 6 – человеческому цитоплазматическому актину 1 (42 кДа, рисунок 5).

Белки, соответствующие остальным полосам, идентифицированы не были. Полученные данные позволяют предположить, что КФБ способны как адсорбировать белки из фетальной бычьей сыворотки в процессе культивирования, так и содержать в своем составе белки из атеросклеротических бляшек после их выделения.

Обсуждение

Проведение экспериментов по изучению патогенного действия как экзогенных, так и эндогенных наночастиц требует их полной характеристики, которая включает в себя оценку формы посредством электронной или атомно-силовой микроскопии, оценку размерности методами динамического рассеяния света, а также электронной или атомно-силовой микроскопии, оцен-

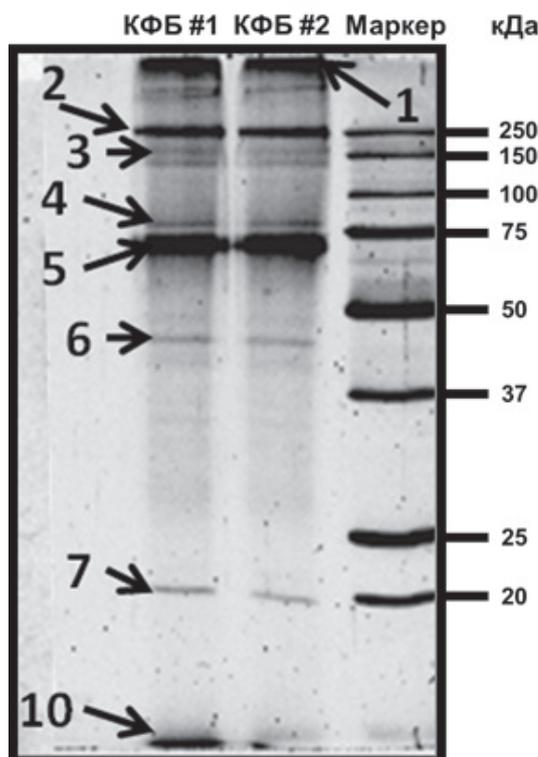


Рисунок 1.

Электрофореграмма белков КФБ, выделенных из атеросклеротических бляшек. Окраска Sypro Ruby, маркер молекулярных масс Precision Plus (Bio-Rad)

Figure 1.

Gel electrophoresis of proteins extracted from plaque-derived calcium phosphate bions. Sypro Ruby staining, Precision Plus Standard

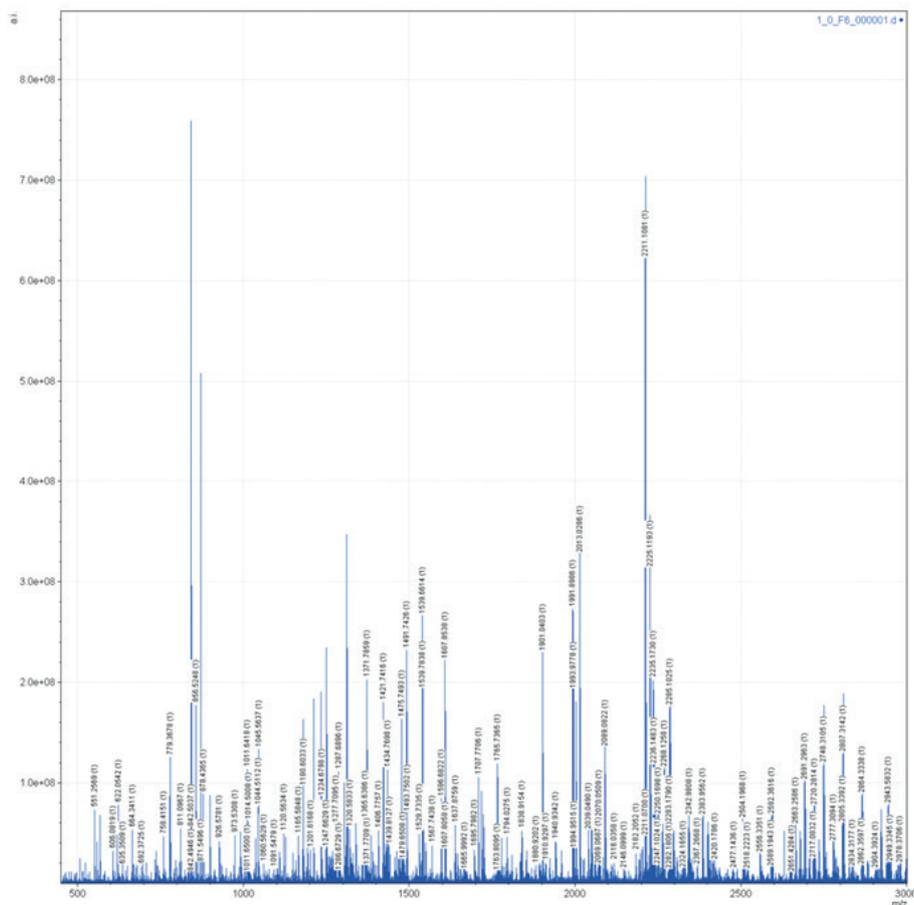
ку кристалличности методами спектроскопии комбинационного рассеяния света и рентгеновской порошковой дифрактометрии, анализ минерального профиля методами энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, атомно-эмиссионной спектроскопии, инфракрасной спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния света и рентгеновской порошковой дифрактометрии, а также анализ органического профиля методами жидкостной и газовой масс-спектрометрии. В данной работе был выполнен анализ белкового состава КФБ из атеросклеротических бляшек крупных артерий человека при помощи МАЛДИ-ВР-МС, который по-

Рисунок 2.

Масс-спектр продуктов триптического гидролиза белковой фракции, соответствующей полосе 1 на гель-электрофоре

Figure 2.

Mass spectrum of the tryptic hydrolysis products from the band 1



казал адсорбцию к КФБ как бычьих белков (из сыворотки для культивирования, так и человеческих белков (из бляшек). Ранее масс-спектрометрический анализ протеомного профиля бионов был проведен группой из Тайваня, которая показала присутствие в КФБ фетуина-А, альбумина, апополипротеинов А-I, А-II и С-III, протромбина, компонента комплемента С3, С4 и Н, фактора комплемента В, альфа-субъединицы гемоглобина, бета-субъединицы фетального гемоглобина, альфа-1-антипротеиназы, витамин К-зависимых белков С и S, серотрансферрина, факторов коагуляции V, IX и X, ингибитора фактора коагуляции XIIa, витамин D-связывающего белка, адипонектина, альфа-2-макроглобулина, антитромбина-III, альфа-фетопротеина, белка HSP90, тромбоспондина-1, секреторируемого фосфопротеина 24, остеопонтина, альфа-2-антиплазмина, протеиндисульфидизомеразы, эндоплазмина, маннозосвязывающего белка С, альфа-цепи фибриногена и предшественника аль-

фа-1-макроглобулина/бикунина [2]. Несмотря на такое разнообразие выявленных белков, все они имели бычье происхождение, поскольку для культивирования КФБ традиционно используется фетальная бычья сыворотка [2]. В проведенной работе также было показано, что КФБ адсорбируют в том числе и человеческие белки, в частности, из атеросклеротических бляшек, сохраняя таким образом профиль того микроокружения, в котором они находятся. При этом качественный белковый состав КФБ, выделенных из атеросклеротических бляшек, практически не отличается от такового искусственно синтезированных КФБ [3].

Заключение

КФБ, выделенные из атеросклеротических бляшек крупных артерий человека, содержат в своем составе те же белки, что и искусственно синтезированные КФБ, однако адсорбируют не только белки сыворотки, но и белки бляшки.

Литература / References:

1. Heiss A, Pipich V, Jahnen-Dechent W, Schwahn D. Fetuin-A is a mineral carrier protein: small angle neutron scattering provides new insight on Fetuin-A controlled calcification inhibition. *Biophys J.* 2010; 99 (12): 3986-3995.
2. Wu CY, Young L, Young D, Martel J, Young JD. Bions: a family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids. *PLoS One.* 2013; 8 (9): e75501.
3. Kutikhin AG, Velikanova EA, Mukhamadiyarov RA, Glushkova TV, Borisov VV, Matveeva VG., et al. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions. *Sci Rep.* 2016; (6): 27255.
4. Larance M, Lamond AI. Multidimensional proteomics for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015; 16 (5): 269-280.
5. Altelaar AF, Munoz J, Heck AJ. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat Rev Genet.* 2013; 14 (1): 35-48.

Сведения об авторах

Южалин Арсений Евгеньевич, постдок, Оксфордский институт радиационной онкологии, Оксфордский университет, Оксфорд, Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии

Вклад в статью: разработка идеи и дизайна исследования; написание статьи

Демидов Евгений Александрович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярных биотехнологий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Вклад в статью: проведение экспериментов

Пельтек Сергей Евгеньевич, кандидат биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярных биотехнологий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Вклад в статью: разработка идеи и дизайна исследования; проведение экспериментов

Authors

Dr. Arseniy E. Yuzhalin, DPhil, Postdoctoral Researcher, CRUK/MRC Oxford Institute for Radiation Oncology, Old Road Campus Research Building, Roosevelt Drive, Oxford OX3 7DQ, United Kingdom

Contribution: conceived and designed the study; wrote the manuscript

Mr. Evgeniy A. Demidov, MSc, Junior Researcher, Laboratory for Molecular Biotechnology, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Contribution: performed the experiments

Prof. Sergey E. Peltek, PhD, Chief Researcher, Laboratory for Molecular Biotechnology, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Contribution: conceived and designed the study; performed the experiments

Корреспонденцию адресовать:

Южалин Арсений Евгеньевич,
55C, Healdy Way, Oxford, OX30LS, United
Kingdom
E-mail: yuzhalin@gmail.com

Статья поступила: 10.05.18 г.

Принята к печати: 31.05.18 г.

Corresponding author:

Dr. Arseniy E. Yuzhalin,
55C, Healdy Way, Oxford, OX30LS, United
Kingdom
E-mail: yuzhalin@gmail.com

Acknowledgements: There was no funding for this article.

**Публикации Всемирной организации
здравоохранения****Tuberculosis surveillance and monitoring report
in Europe 2018****(Доклад об эпиднадзоре и мониторинге за
туберкулезом в Европейском регионе, 2018).**

- Европейское региональное бюро ВОЗ. Копенгаген. 2018 г. – 195 стр.

Хотя на Европейский регион ВОЗ приходит- ся только 3% глобального бремени туберкуле- за (ТБ), он имеет один из самых высоких по- казателей туберкулеза с множественной лекар- ственной устойчивостью (МЛУ-ТБ). Несмотря на неуклонное снижение бремени туберкулеза в течение последнего десятилетия, он остае- ся угрозой для общественного здравоохра- нения в Регионе. В 2016 году в Европейском ре- гионе ВОЗ было зарегистрировано 290 000 но- вых случаев ТБ и 26 000 случаев смерти от ту- беркулеза, что эквивалентно 32 и 2,8 на 100 000 населения соответственно. ТБ тесно связан с ВИЧ, который ослабляет иммунную систему, а также с неблагоприятными социальными ус- ловиями жизни, такими как нищета, безработи- ца, тюремное заключение, миграция. Больные

туберкулезом чаще всего являются молодыми людьми в восточной части Региона и мигран- тами. Однако туберкулез встречается и у по- жилих коренных жителей в Западной Европе. В настоящем докладе представлен обзор по- следней эпидемиологической ситуации и сред- несрочного прогресса в осуществлении Плана действий по борьбе с туберкулезом для Евро- пейского региона ВОЗ 2016-2020 годов. Также доклад посвящен 10-й годовщине Берлинской декларации о туберкулезе - «Все против тубер- кулеза».

¹Полный текст на английском языке на сайте Европейского регионального бюро ВОЗ:

[http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_ file/0010/364663/tb-report-2018.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0010/364663/tb-report-2018.pdf)

¹«Экспресс-информация Документационного центра Всемирной организации здравоохранения», март, 2018г.