

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ ПРОЦЕССОВ
РАЗДЕЛЕНИЯ. ХРОМАТОГРАФИЯ

УДК 543.183

МОДЕЛИРОВАНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ
АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ В УСЛОВИЯХ ОФ ВЭЖХ

© 2022 г. К. Е. Полунина^а, О. С. Федоткина^б, И. А. Полунина^а, А. К. Буряк^{а,*}

^аИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, 119071 Москва, Россия

^бООО “СамараНИПИнефть”, 443010 Самара, Россия

*e-mail: akburyak@mail.ru

Поступила в редакцию 15.11.2021 г.

После доработки 15.11.2021 г.

Принята к публикации 19.11.2021 г.

Экспериментальные результаты определения параметров хроматографического удерживания анти-микробных пептидов иммунизированной гемолимфы *Galleria mellonella* в градиентной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) сопоставлены с результатами теоретических расчетов, использующих для предсказания времен удерживания пептидов анализ параметров их гидрофобности (модель SSRCalc) или эффективных энергий адсорбции аминокислотных остатков и компонентов растворителя (модель BioLCCC). Установлено, что ни одна из рассмотренных моделей полностью не описывает разделения антимикробных пептидов, отличающихся структурой и составом, но алгоритм SSRCalc позволяет добиться приемлемой надежности прогнозирования удерживания пептидов массой 1–7 кДа. Наибольшие погрешности аппроксимации выявлены у пептидов с дисульфидными мостиками и незащищенными концевыми полярными функциональными группами.

Ключевые слова: антибактериальные пептиды, ОФ ВЭЖХ, метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ), модели

DOI: 10.31857/S004445372206019X

Жидкостная хроматография – один из основных методов разделения и очистки биомолекул [1]. Хроматографическое разделение пептидов обычно предшествует их масс-спектрометрическому анализу и идентификации. Для установления связи между строением пептидов и величинами их хроматографического удерживания часто применяется полуэмпирическое моделирование, основанное на общих представлениях о механизмах сорбции в системах разного типа. Модели SSRCalc (Sequence Specific Retention Calculator) [2–5] и BioLCCC (Liquid Chromatography of Biomacromolecules at Critical Conditions) [6–9] для описания удерживания пептидов используют современные подходы, основанные на больших выборках.

Аддитивные модели хроматографического разделения пептидов, и в частности SSRCalc, могут более или менее точно предсказывать время их удерживания и порядок элюирования в зависимости от аминокислотного состава, в предположении, что характер взаимодействия пептидов с поверхностью сорбента определяется суммарным эффектом различных взаимодействующих участков, рассредоточенных по всей аминокислотной цепочке [2]. Аддитивные модели расчетов

хроматографических параметров разделения особенно актуальны для пептидов, содержащих большое количество различных аминокислот, каждая из которых имеет различные взаимодействующие группы. Изначально простая модель может быть значительно усложнена введением многочисленных эмпирических поправок, учитывающих конкретные условия высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и особенности пептидов [5]. Порядок элюирования пептидов в обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ может быть сопоставлен с их относительной гидрофобностью, коэффициентом распределения в системе октанол/вода, поляризуемостью, дипольным моментом, объемом молекул и другими физико-химическими и структурными характеристиками. При увеличении длины цепи пептидов в ее равновесной конфигурации помимо гидрофобных аминокислот, лежащих на поверхности гидрофобной твердой фазы и взаимодействующих с ней, появляются петли и хвосты, простирающиеся в раствор и не имеющие контакта с поверхностью. Модель BioLCCC (жидкостная хроматография биополимеров в критических условиях), реализованная в виде программы “Теоретический хроматограф” [9], основана на

представлении об адсорбции макромолекулы как цепи случайных блужданий, адсорбирующейся в щелеобразной поре [7, 8]. Вблизи критической точки адсорбции локализованное состояние макромолекулы характеризуется наличием большого количества десорбированных петель и хвостов, а время удерживания пептидов определяется балансом между потерями энтропии цепи вблизи поверхности и приращением энергии в результате образования связей между отдельными аминокислотами и поверхностью. Модель BioLCCC представляет макромолекулярный подход к описанию закономерностей хроматографического разделения пептидов в зависимости от их аминокислотной последовательности в условиях градиентной хроматографии на обращенной фазе SiO₂-C18 при заданных экспериментальных условиях (в том числе размеры колонки, профиль градиента и состав компонентов растворителя). В случае коротких пептидных цепей, адсорбирующихся практически целиком, без образования десорбированных петель, модель BioLCCC сводится к аддитивной [6].

Расчетные методы прогнозирования хорошо работают в случаях, когда детальные исследования проводятся в каком-нибудь одном ограниченном классе соединений. В составе гемолимфы *Galleria mellonella* (*GM*) содержатся представители различных классов органических соединений, пептиды и белки с разной длиной цепи [10–13]. Многие из них обладают высокой степенью идентичности последовательностей аминокислот и близкими физико-химическими характеристиками [13, 14]. Полностью учесть все молекулярные взаимодействия в такой хроматографической системе практически невозможно, поэтому в первом приближении для прогнозирования их хроматографического удерживания используются простые и универсальные модели.

Цель данной работы – сопоставление экспериментально определенных параметров хроматографического удерживания антибактериальных пептидов гемолимфы *GM* в условиях ОФ ВЭЖХ с результатами теоретических расчетов, использующих анализ параметров гидрофобности пептидов (модель SSRCalc) или эффективных энергий адсорбции аминокислотных остатков и компонентов растворителя (модель BioLCCC) для предсказания времен удерживания пептидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта исследования использовали личинки *GM*, выращенные в питомнике Института теоретической и экспериментальной биологии РАН [15]. Антибактериальные пептиды индуцировались в гемолимфе личинок *GM* в результате их иммунизации бактериями *Escherichia coli* (*E. coli*) штамм M17 или несимметричным ди-

метилгидразином [12–14]. Способы получения гемолимфы личинок, подготовки образцов к биохимическим и физико-химическим исследованиям подробно описаны в [13].

Использовали ацетонитрил AcCN (for HPLC, Aldrich, США), 99% трифторуксусную кислоту ТФУ (Alfa Aesar, Германия) и тридистиллированную воду, очищенную на фильтрах Millipore (Milli-P QG, Waters, США).

Анализ и разделение антибактериальных пептидов методом ОФ ВЭЖХ проводили на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18, заполненной SiO₂-C18 (Agilent Technologies Inc., США), размером 150 × 4.6 мм (размер зерна 5 мкм, диаметр пор 80 Å, температура 25°C), упакованной в жидкостной хроматограф Agilent 1200 с диодно-матричным детектором и программным обеспечением ChemStation A.10.02. Свободный объем колонки определяли, используя нитрит натрия. Разделение пептидов (объем вводимой пробы 20 мкл) осуществляли в условиях градиентного элюирования при переменном во времени составе бинарного растворителя: А – 0.04% (v/v) раствор ТФУ в воде (рН 2.5), В = AcCN. Скорость элюента 0.5 мл мин⁻¹. Режим градиентного элюирования: 5–80% В в диапазоне 0–30 мин, 80–100% В в диапазоне 30–32 мин. Отбор фракций производили каждую минуту.

Различия в термодинамических величинах удерживания исследуемых веществ оценивали по разности их дифференциальных мольных энергий адсорбции Гиббса: $\delta(\Delta G) = -RT \ln(k_i/k_s^{-1})$, где k_i и k_s – факторы удерживания исследуемого вещества и стандарта, в качестве которого был выбран пептид *Galleria defensin* 1.

Масс-спектрометрическое исследование фракций гемолимфы *GM* методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) проводили с помощью масс-спектрометра UltraFlex II TOF (Bruker Daltonics, Германия), оснащенного азотным лазером ($\lambda = 337$ нм, энергия лазерного излучения 110 кДж, частота импульса до 20 Гц), времяпролетным масс-анализатором с рефлектоном и программным обеспечением для сбора и обработки масс-спектров FlexControl 3.4 и FlexAnalysis 3.4. Ускоряющее напряжение 25 кВ. Масс-спектры получали в режиме регистрации положительных ионов. Изучение фрагментации исходных метастабильных протонированных молекул пептидов в режиме распада за пределами ионного источника (метод МАЛДИ-МС/МС) проводили с помощью масс-спектрометра UltraFlex II TOF (Bruker Daltonics), оснащенного неодимовым лазером ($\lambda = 355$ нм, энергия лазерного излучения 105 кДж, частота импульса до 20 Гц) и времяпролетным масс-анализатором с рефлектоном. Масс-спектры ионов-продуктов

регистрировали методом LIFT (Bruker Daltonics): начальное напряжение и ускоряющая разность потенциалов составляли 7 и 28 кВ, соответственно. Точность измеренных моноизотопных масс $[M + H]^+$ в режиме рефлектрона составляла 0.007%, точность измеренных усредненных масс в линейном режиме 0.05–0.1%, точность измеренных масс фрагментов 1–2 Да (0.02–0.1%). Образцы для МАЛДИ готовили на мишенях AnchorChip с матрицей НССА (α -циано-4-гидроксикоричная кислота) от Bruker Daltonics (Германия).

Использовали поисковую систему Mascot [16] для определения первичной структуры обнаруженных пептидов на основании информации, получаемой при их диссоциации [17]. Поиск проводили по массам метастабильных протонированных молекул пептидов $[M + H]^+$, полученным в работах [12–14] и присутствующим в базе данных NCBI [18]. Первичную структуру неизвестных пептидов определяли на основании результатов процедуры секвенирования *de novo* [19].

Для расчетов теоретических времен удерживания пептидов t_R использовали алгоритмы SSRCalc [2] и BioLCCC [9].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В табл. 1 приведены антибактериальные пептиды, идентифицированные методом МАЛДИ-МС в составе гемолимфы *GM* [12–14]. В соответствии с аминокислотными последовательностями и структурными особенностями, эти пептиды относят к трем разным классам: 1) линейные α -спиральные пептиды, не содержащие остатков цистеина (например, цекропины); 2) цистеинстабилизированные пептиды, содержащие дисульфидные мостики (например, дефензины); 3) пролинсодержащие пептиды со сверхпредставлением пролина и/или глициновых остатков. По данным антимикробных тестов [13, 14], эти пептиды обладают антибактериальной активностью по отношению к грамотрицательным бактериям *E.coli*, а также индуцируются в ответ на воздействие токсичного несимметричного диметилгидразина.

Результаты экспериментального определения времен удерживания t_R пептидов на сорбенте $\text{SiO}_2\text{-C18}$ приведены в табл. 2, 3. Кроме данных пептидов, исследованы их фрагменты и неизвестные пептидные компоненты массой 1–3 кДа, обнаруженные в составе гемолимфы иммунизированных личинок *GM* и идентифицированные масс-спектрометрически [12–14]. Образование новых пептидных продуктов, обладающих антибактериальной активностью, связывают как с развитием иммунного ответа организма *GM* на воздействие бактерий и токсикантов, так и с деструкцией

пептидов под их воздействием. Экспериментальные значения t_R пептидных продуктов сопоставлены с результатами расчетов, использующих анализ параметров гидрофобности пептидов (модель SSRCalc) и эффективных энергий адсорбции аминокислотных остатков и компонентов растворителя (модель BioLCCC). Для всех пептидов рассчитаны факторы удерживания k относительно стандартов – Galleria defensin 1 или Nisin и определены дифференциальные мольные энергии Гиббса, характеризующие процесс разделения. Обнаружено, что экспериментальные значения t_R антибактериальных пептидов растут с увеличением их массы M и количества N аминокислотных остатков в цепи при переходе от пептида № 3 (N 37) к пептидам № 5 и 6 (N 43, 42) с линейной структурой. Значения t_R , рассчитанные с использованием алгоритма BioLCCC, растут в той же последовательности, что и экспериментальные, но их значения сильно отличаются между собой. Наиболее корректно эта модель описывает поведение пептидов №№ 2, 8 и их фрагментов (2f, 8f). Модель SSRCalc практически идеально предсказывает хроматографическое поведение пептида № 5 и несколько хуже – пептидов № 2, 3, 6, 8. Обе модели смогли предсказать аномальное поведение пептида № 2 (N 39), который выходит из хроматографической колонки позже массивного пептида № 8 (N 60).

Модель SSRCalc объясняет сильное удерживание на $\text{SiO}_2\text{-C18}$ пептида № 2 его высокой относительной гидрофобностью P , так как в первичной структуре цекропинов содержится более половины гидрофобных остатков (табл. 1). В свою очередь, слабое удерживание пептида № 8 модель BioLCCC объясняет ионизацией в кислой среде его N-концевой аминогруппы (лизин, K) и электростатическим отталкиванием от гидрофобной поверхности твердой фазы. У цекропина № 2 в данной среде стандартная энергия взаимодействия с поверхностью концевых –COOH-групп (E и D, аспарагиновая и глутаминовая кислоты) будет достаточно большой.

Дефензины *GM* №№ 4 и 5 имеют одинаковое количество аминокислотных остатков (N 43), расположенных в одинаковой последовательности, и отличаются только одним звеном: S (серин) у № 4 и R (аргинин) у № 5. Модели SSRCalc и BioLCCC прогнозируют примерно одинаковые значения t_R для этих пептидов (табл. 2). Но их экспериментальные значения t_R отличаются между собой на 1.4 мин: первым из колонки выходит дефензин № 5 с 2 дисульфидными связями в первичной структуре. Его значение t_R почти идеально предсказывает модель SSRCalc. Пептид № 4, имеющий три дисульфидные связи, которые усиливают его взаимодействие с гидрофобной поверхностью сорбента, выходит позже, и его зна-

Таблица 1. Антибактериальные пептиды, обнаруженные в гемолимфе *Galleria mellonella*

№ пептида	Пептид	Аминокислотная последовательность пептида (однобуквенный код)	<i>M</i> , Да	<i>N</i>	<i>pI</i>
1	Cecropin-B-analog	WKVFKKIEKIGRNIRNGIVKAGPLIAVLGEAKAL	3728	34	11.02
2	Cecropin-D-like peptide	ENFFKEIERAGQRIRDAIISAAPAVETLAQAQKIIKGGD	4253	39	6.45
3	Proline-rich antimicrobial peptide 1	DIQIPGIKKPTHRDIIPNWNPNVRTQPWQRFGGNKS	4320	37	10.99
4	Galleria defensin 1	DTLIGSCVWGATNYTSDCNAECKRRRGYKGGHCGSFLNVNCWCE	4715	43	7.25
5	Galleria defensin 2	DTLIGRCVWGATNYTSDCNAECKRRRGYKGGHCGSFLNVNCWCE	4786	43	7.25
6	Lebocin-like anionic peptide 1	EADEPLWLYKGDNIERAPTADHPILPSIIDVKLDPNRRYA	4816	42	4.51
7	Proline-rich antimicrobial peptide 2	EIRLPEPFRFPSPTVPKPIDIDPILPHPWSPRQTYPIIARRS	4929	42	9.97
8	Anionic antimicrobial peptide 2	ETESTPDYLKNIQQQLEEYTKNFNTQVQNAFDSKIKSEVNNFIESLGKILNTEKKE-APK	6980	60	4.80
9	Lysozyme	KTFTRCELVQALRRQGFDEAKLRDWVCLVENESRGRTDIVGKPNKNGSRDYGLFQINDKYWCSNTSKAGKDCNITCSQLLTDITVASKCAKKVYKRHNFMAYGWRNHCQNKPLDISK	14027	121	9.53
10	Apolipoprotein-3	DASTPLQDLEKHAAEFQKTFSEQLNAFTNKDTKEFN-TALKEGSDSVLQQLNALASSLQKALNDANGKAKEAL-EQTRTNLERTAEELRRAHPDVERQAALRDRLQTAVQATVQETQKLAKTVGANLEETNKKLAPQIKAYDDFVKQAQEVQKKLHEAASKQ	18075	186	8.59
11	27 kDa hemolymph protein precursor	DTLKAQCKKNGAEDKAQDVENAANKNFVECVKGLFD-FSTIKKEIEDAKPNGALDEVFGKYCAKSPQLKTCIHTLTSATPCLEASVREQVGPINNGADQLIDFICYKDGDRIALFIAEGGPECFQEKSEGIRAAEKLKNNVGSVEAAQSLTLVEQCGKYDELTAIISLEECSTPTPGNMAESLFRFVRKGSPCNKAAPLKN	23764	219	5.3

Обозначения: *M* – масса, *N* – число аминокислотных остатков в пептиде, *pI* – изоэлектрическая точка.

Таблица 2. Физико-химические характеристики хроматографического разделения смеси антибактериальных пептидов *Galleria mellonella* при градиентном элюировании AcCN (*f* – фрагмент пептида)

№ пептида	Пептид	<i>M</i> , Да	<i>k</i>	$\delta(\Delta G)$, кДж моль ⁻¹	<i>t_R</i> , мин		
					Эксперимент	Расчет SSRCalc	Расчет BioLCCC
3	Proline-rich antimicrobial peptide 1	4320	6.6	0.5	13.8	15.2	17.9
2 f	Cecropin-D-like peptide	2078	6.9	0.4	14.3	11.7	15.2
5	Galleria defensin 2	4786	7.2	0.3	14.8	14.4	18.4
6	Lebocin-like anionic peptide 1	4816	7.4	0.2	15.2	16.6	19.9
4	Galleria defensin 1	4715	8.0	стандарт	16.2	14.6	18.5
8 f	Anionic antimicrobial peptide 2	3420	8.5	-0.2	17.2	15.0	16.8
2 f	Cecropin-D-like peptide	3031	8.9	-0.3	17.9	15.8	17.9
8	Anionic antimicrobial peptide 2	6980	9.4	-0.4	18.8	17.7	17.3
2	Cecropin-D-like peptide	4253	6.6	-0.5	19.2	18.1	18.1

Таблица 3. Физико-химические характеристики хроматографического разделения смеси антибактериальных пептидов *Galleria mellonella* при добавлении 0.04% ТФУ в AcCN при градиентном элюировании

№ пептида	Пептид	M, Да	k	$\delta(\Delta G)$, кДж моль ⁻¹	t_R , мин		
					Эксперимент	Расчет SSRCalc	Расчет BioLCCC
3	Proline-rich antimicrobial peptide 1	4320	9.7	0.5	26.4	26.5	25.8
6	Lebocin-like anionic peptide 1	4816	10.7	0.2	29.2	28.5	28.7
4	Galleria defensin 1	4715	11.4	0.03	30.9	25.5	26.6
	Nisin	3354	11.5	стандарт	31.2	22.5	24.3
1	Cecropin-B-analog	3728	11.6	-0.02	31.4	30.5	28.3
7	Proline-rich antimicrobial peptide 2	4929	12.2	-0.2	33.7	31.1	29.1
2	Cecropin-D-like peptide	4253	13.1	-0.3	35.2	30.6	26.2
8	Anionic antimicrobial peptide 2	6980	13.9	-0.5	37.2	30.1	25.2
10	Apolipophorin-3	18075	15.7	-0.8	41.7	33.4	24.5

чение t_R не удается правильно предсказать ни одной моделью.

При добавлении 0.04% ТФУ в AcCN при градиентном элюировании пептидных смесей в течение 40 мин порядок выхода пептидов из колонки в целом сохраняется при увеличении времени удерживания. За исключением S-содержащих дефензина и низина, а также цекропинов № 1, 2 экспериментальные значения t_R пептидов растут с увеличением длины их цепи (табл. 3). Наблюдаемая инверсия выхода пептидов №№ 2 и 8, по сравнению с данными табл. 2, связана с изменением состава и кислотности элюента, влияющей, как было отмечено выше, на степень ионизации этих пептидов.

Прогнозы значений t_R (SSRCalc и BioLCCC) хорошо сбываются для пептидов №№ 3 и 6, но обе модели неадекватно прогнозируют удерживание пептидов №№ 2, 8, 10. Особенно далеки от истины прогнозы для этих пептидов модели BioLCCC. Модель SSRCalc в этой системе работает несколько лучше, так как дает меньшие ошибки в прогнозах удерживания пептидов №№ 1, 2, 7, 8, 10. Наличие трех и двух дисульфидных связей в структуре дефензина и низина, отличает характер их взаимодействия с неполярной поверхностью октадецилсиликагеля от других пептидов, не содержащих этих связей.

В табл. 4 приведены значения относительной гидрофобности P исследованных пептидов, рассчитанные с помощью алгоритма SSRCalc. Крупные молекулы фермента лизоцима (№ 9, N 121), белка гемолимфы 27 кДа (№ 11, N 219) и аполипофорина-3 (№ 10, N 186), обнаруженные в гемолимфе иммунизированных личинок *GM*, удерживаются на SiO₂-C18 лишь немного дольше, чем

небольшие пептиды с N 39, 42, 60. Сравнительно небольшая величина относительной гидрофобности этих белков обусловлена ионизацией в кислой среде ряда их аминокислотных остатков и превращением пептидов в многозарядные катионы, энергия взаимодействия которых с гидрофобной поверхностью невелика.

Использование для расчетов алгоритма предсказания вторичной структуры антибактериальных пептидов HyperChem 6.0 (опция Sequence Editor [20]) позволило объяснить эту аномалию тем, что объем биологически активной конформации молекулы пептида № 11 с учетом радиусов Ван-дер-Ваальса меньше объема молекулы пептида № 10 (табл. 5). Уменьшение объема приводит к уменьшению площади гидрофобного контакта молекулы с поверхностью неподвижной фазы и, как следствие, к уменьшению фактора удерживания. Обнаруженная зависимость факторов удерживания пептидов от их поляризуемости и ван-дер-ваальсовых объемов (табл. 5) свидетельствует о превалирующем вкладе в процесс адсорбции исследуемых пептидов дисперсионных взаимодействий с гидрофобной поверхностью.

Как отмечалось выше, алгоритм SSRCalc сравнительно лучше предсказывает удерживание небольших пептидов, поэтому он был использован для расчета параметров удерживания индуцированных пептидов массой 1–3 кДа, ранее не представленных в базах данных. Экспериментальное исследование данных пептидов позволило получить совокупность хроматографических и масс-спектрометрических характеристик, отражающих их уникальные физико-химические свойства. В табл. 6 приведены результаты *de novo* секвенирования, т.е. установления аминокислотной последовательности некоторых неизвестных

Таблица 4. Значения логарифмов фактора удерживания k в ОФ ВЭЖХ и относительной гидрофобности P антибактериальных пептидов *Galleria mellonella*, рассчитанные с использованием алгоритма SSRCalc

№ пептида	Пептид	M , Да	$\lg k$	$\lg P$
3	Proline-rich antimicrobial peptide 1	4320	0.99	1.52
6	Lebocin-like anionic peptide 1	4816	1.03	1.58
1	Cecropin-B-analog	3728	1.06	1.61
2	Cecropin-D-like peptide	4253	1.12	1.68
8	Anionic antimicrobial peptide 2	6980	1.14	1.67
7	Proline-rich antimicrobial peptide 2	4929	1.10	1.71
9	Lysozyme	14027	1.10	1.64
11	27 kDa Hemolymph protein precursor	23764	1.17	1.75
10	Apolipoprotein-3	18075	1.20	1.70

Наибольший фактор удерживания у пептида № 10 (табл. 4, 5), хотя его масса и относительная гидрофобность P меньше, чем у белка № 11.

Таблица 5. Значения поляризуемости (α) и ван-дер-ваальсовых объемов (V) антибактериальных пептидов *Galleria mellonella*, рассчитанные с использованием алгоритма предсказания вторичной структуры антибактериальных пептидов HyperChem

№ пептида	Пептид	M , Да	k	α , Å ³	V , Å ³
3	Proline-rich antimicrobial peptide 1	4320	9.7	436	3520
6	Lebocin-like anionic peptide 1	4820	10.7	473	3945
4	Galleria defensin 1	4715	11.4	463	3953
7	Proline-rich antimicrobial peptide 2	4929	12.2	501	4282
8	Anionic antimicrobial peptide 2	6980	13.9	672	5756
9	Lysozyme	14027	12.6	1395	10807
11	27 kDa Hemolymph protein precursor	23764	14.6	2113	12156
10	Apolipoprotein-3	18075	15.7	1754	12493

пептидов, предсказанные на основе анализа масс-спектров их фрагментации.

Результаты такой идентификации носят вероятностный характер, так как на основании данных МАЛДИ-МС/МС для ионов с одинаковой массой можно предположить несколько разных аминокислотных последовательностей (табл. 6). Выбрать единственно верную последовательность можно путем сопоставления прогнозируемого и экспериментально измеренного времени удерживания каждого пептида. Жирным шрифтом в табл. 6 выделены структуры, хроматографические параметры которых наиболее соответствуют экспериментальным данным. Таким образом, использование хроматографической информации позволяет из нескольких кандидатов на возможные аминокислотные последовательности, полученные из спектров МАЛДИ-МС/МС, выбрать те, которые наиболее надежно описывают аминокислотный состав пептида.

Важной характеристикой, подтверждающей достоверность масс-спектрометрической идентификации новых пептидов, служит наличие зависимости порядка их элюирования от физико-химических характеристик (например, относительной гидрофобности P и поляризуемости α), теоретически рассчитанных для полученных последовательностей аминокислот (рис. 1). Для короткоцепочечных пептидов, проявляющих антибактериальную активность против *E. coli*, получены линейные зависимости: $\lg k = 1.7961 \lg P - 0.268$ (коэффициент корреляции $r^2 = 0.963$) и $k = 51.290\alpha - 95.369$ ($r^2 = 0.975$). Они характеризуют потенциальную возможность данных пептидов удерживаться на SiO₂-C18 в соответствии со своей относительной гидрофобностью и поляризуемостью.

Как уже отмечалось, исследованные пептиды, проявляющие антибактериальную активность,

Таблица 6. Сопоставление экспериментальных данных (МАЛДИ-МС/МС и ОФ ВЭЖХ) с рассчитанными (SSRCalc) значениями времен удерживания t_R и относительной гидрофобности P ранее неизвестных антибактериальных пептидов *Galleria mellonella*

[M + H] ⁺ , Да	Возможные аминокислотные последовательности пептидов	Расчет SSRCalc		Эксперимент t_R , мин
		P	t_R , мин	
1105	PTDENPDRY	8.45	5.3	13.0
	PTDERLGYR	13.99	7.7	
	TPDENPDYR	9.32	5.7	
1233	RNKESTSVESP	5.13	4.0	13.5
	RNKESTSVEAL	11.45	6.6	
	RELESTLETR	17.16	9.0	
1794	KHESEDTPYSESTKF	16.25	8.6	16.5
	KHESKCNFLSESEGCS	14.61	7.9	
	KHESESEFLSESTQF	25.97	12.7	
1927	PERVPKSDEPSAAYNLR	17.30	9.1	17.0
	RMNYAASPFP SAHPHFV	28.91	13.9	
	PERVPKSDEPSAAYHVF	20.77	10.5	
2559	CMSMWMCGKSSRIRYMMIHAN	34.30	16.2	21.0
	FEQCMMCGQSSRIRYMMIHAN	30.35	14.5	
	IYKCMCGKSSRIRYMMIHAN	28.70	13.9	

имеют множество различных функциональных групп и принадлежат к трем разным классам в соответствии с их аминокислотными последовательностями и структурными особенностями. Ни одна из использованных моделей не может предсказать разделение всех данных пептидов, так как их удерживание определяется совокупностью различных факторов, отражающих взаимодействия на границе раздела фаз (заряд и конформация молекул, их гидрофобность, поляризуемость, объем, дипольный момент и др.), и преобладанием какой-либо составляющей, связанной с осо-

бенностями первичной структуры пептидов. На рис. 2 сопоставлены экспериментальные и рассчитанные разными методами времена удерживания некоторых антибактериальных пептидов, обнаруженных в составе иммунизированной гемолимфы *GM* [14].

Коэффициенты корреляции между экспериментальными и рассчитанными значениями t_R , полученными методами SSRCalc (пептиды массой 1–4 кДа и №№ 2, 5, 8, 10) и BioLCCC (пептиды массой 1–4 кДа и №№ 8, 8f, 2, 2f) составляют соответственно 0.887 и 0.775. Ни один из рассмотренных алгоритмов полностью не описывает разделения всех антимикробных пептидов *GM*, по-видимому, вследствие того, что взаимодействие пептидов с силикагелем C18 является не только дисперсионным. Наибольшие погрешности аппроксимации соответствуют пептидам, структура которых стабилизирована дисульфидными мостиками, а также пептидам с незащищенными концевыми группами, так как вклады этих полярных функциональных групп в баланс гидрофильных и гидрофобных свойств наиболее существенны. Аддитивная схема расчета SSRCalc позволяет добиться приемлемой надежности прогнозирования удерживания небольших пептидов массой 1–7 кДа. Полученные корреляционные зависимости могут стать основой для разработки способа идентификации неизвестных антибактериальных

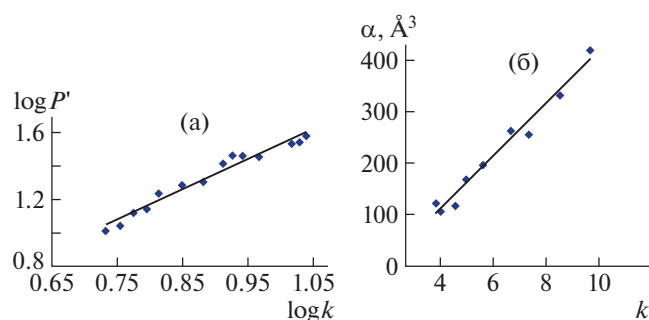


Рис. 1. Зависимости рассчитанных значений относительной гидрофобности P (а) и поляризуемости α (б) индуцированных пептидов *Galleria mellonella* от фактора удерживания k .

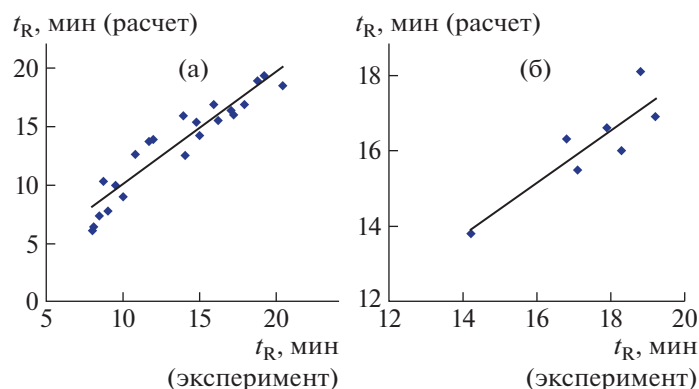


Рис. 2. Сопоставление экспериментальных и рассчитанных времен хроматографического удерживания антибактериальных пептидов *Galleria mellonella*; а – алгоритм SSRCalc, б – алгоритм BioLCCC.

пептидов. Они служат определяющим фактором при оценке надежности и достоверности идентификации пептидов для проведения *de novo* секвенирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные модели прогнозирования хроматографического разделения пептидов SSRCalc и BioLCCC являются упрощенными моделями, а предложенный подход – первым приближением, так как многие детали строения реальной структуры пептидов оказываются за рамками рассмотрения. Кроме того, данные теоретические модели строятся в предположении об идеальности модели адсорбирующейся цепи, т.е. о локальности адсорбционного взаимодействия аминокислотного остатка с поверхностью, происходящего при замене контакта растворитель–поверхность на контакт аминокислотный остаток–поверхность. Ни один из использованных алгоритмов полностью не описывает разделения всех антимикробных пептидов *GM*, так как данные соединения относятся к разным классам в соответствии с их аминокислотными последовательностями и структурными особенностями. Их удерживание на гидрофобной поверхности определяется совокупностью множества факторов, отражающих взаимодействия на границе раздела фаз. Теоретические модели никак не учитывают, что реальные пептиды при определенных условиях хроматографического эксперимента содержат заряженные аминокислотные остатки, что в белках могут существовать вторичные структуры типа спиралей, шпильки или цепей –S–S–, которые вносят свой вклад и искажают теоретические зависимости. Наибольшие погрешности аппроксимации соответствуют пептидам с незащищенными концевыми группами, так как вклады этих полярных функциональных групп в баланс гидрофильных и гидрофобных свойств наиболее существенны, а

взаимодействие таких пептидов с силикагелем С18 является не только дисперсионным. Экспериментальные результаты хроматографического разделения антимикробных пептидов иммунизированной гемолимфы *GM* сравнительно лучше предсказывает модель SSRCalc, которая позволяет добиться практически приемлемой надежности прогнозирования удерживания пептидов массой 1–7 кДа.

Накопление физико-химических данных по удерживанию пептидов в режиме ОФ ВЭЖХ позволит в дальнейшем корректировать имеющиеся модели физико-химического поведения этих соединений, создавать новые модели, обосновывать оптимальные условия разделения смесей, а в сочетании методов ОФ ВЭЖХ с МАЛДИ-МС проводить идентификацию компонентов сложных смесей пептидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dams M., Dores-Sousa J.L., Lamers R.J. et al. // *Chromatographia*. 2019. V. 82. № 1. P. 101.
2. <http://hs2.proteome.ca/SSRCalc/SSRCalc32.html>.
3. Guo D., Mant C.T., Taneja A.K. et al. // *J. Chromatogr. A*. 1986. V. 359. P. 499, 515.
4. Mant C.T., Burke T.W., Black J.A., Hodges R.S. // *Ibid.* 1988. V. 458. P. 193.
5. Krokhin O.V., Craig R.V., Spicer V. et al. // *Mol. Cell. Proteomics*. 2004. V. 3. № 9. P. 908.
6. Горшков А.В., Евреинов В.В., Тарасова А.И., Горшков М.В. // *Высокомолек. соединения. Сер. Б*. 2007. Т. 49. № 4. С. 732.
7. Горшков А.В., Евреинов В.В., Придатченко М.Л. и др. // *Высокомолек. соединения. Сер. А*. 2011. Т. 53. № 12. С. 2150.
8. Tarasova I.A., Guryca V., Pridatchenko M.L. et al. // *J. Chromatogr. B*. 2009. V. 877. P. 433. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.12.047>
9. <http://theorchrom.ru>

10. *Pereira T., de Barros P., Fugisaki L. et al.* // *J. Fungi*. 2018. V. 4. P. 128.
11. *Cutuli M.A., Petronio J.P., Vergalito F. et al.* // *Virulence*. 2019. V. 10. № 1. P. 527.
<https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1621649>
12. *Пурыгин П.П., Срибная О.С., Кленова Н.А. и др.* // Сорбционные и хроматографические процессы. 2011. Т. 11. № 1. С. 42.
13. *Буряк А.К., Срибная О.С., Пурыгин П.П.* // Биомедицинская химия. 2010. Т. 56. № 3. С. 387.
<https://doi.org/10.18097/pbmc20105603387>
14. *Полунин К.Е., Федоткина О.С., Полунина И.А., Буряк А.К.* // Коллоид. журн. 2021. Т. 83. № 5. С. 611.
<https://doi.org/10.31857/S0023291221050128>
15. *Спирidonов Н.А., Рачков А.К., Мухин С.А., Кондрашова М.Н.* Способ получения биологически активных продуктов из личинок большой восковой моли. Патент: 2038086 РФ // Б.И. 1995. № 6.
16. *Николаев Е.Н., Попов И.А., Кононихин А.С. и др.* // Успехи химии. 2012. Т. 81. № 11. С. 1051.
<https://doi.org/10.1070/RC2012v081n11ABEH004321>
17. http://www.matrixscience.com/search_form_select.html
18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/proteins/>
19. *Артеменко К.А., Самгина Т.Ю., Лебедев А.Т.* // Масс-спектрометрия. 2006. Т. 3. № 4. С. 225.
20. <http://www.hyper.com>