

**A HUMÁN SZÉRUM α 1-SAVANYÚ GLIKOPROTEIN
OLIGOSZACHARID-SZERKEZETÉNEK VIZSGÁLATA**

Doktori értekezés tézisei

Molnárné Szöllősi Éva

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémia Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Prof. Inzelt György

Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia doktori program

Programvezető: Prof. Horváth István Tamás

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Szerves Kémiai Tanszék

Témavezető: Dr. Dibó Gábor

Országos Onkológiai Intézet, Biokémiai Osztály

Konzulens: Prof. Kremmer Tibor

Budapest, 2007

1. Bevezetés, célkitűzések

A természetes glikokonjugátumok (glikolipidek, glikoproteinek) számos olyan élettani folyamatban vesznek részt, mint például az anyagcsere- és transzport-folyamatok, a sejtek közötti kommunikáció és az immunológiai jelenségek. Az oligoszacharidok és származékaik fontos szerepet töltenek be a glikokonjugátumok szerkezetében és élettani funkcióiban. Napjainkban a glikoproteinek szénhidrát-szerkezetének, ún. mikroheterogenitásának vizsgálata a proteomika (glikobiológia) fontos kutatási területe, amely során a biomolekulákban megfigyelhető szerkezeti változások és a biológiai funkció között keresik a választ. Ezekben a vizsgálatokban kiemelkedő szerepe van a bioanalitikai (kromatográfias) és szerkezetkutatási (tömeg-spektrometriai, NMR, CD) módszereknek.

Az akut fázis fehérjék a humán szérumban olyan komponensei, amelyek többségükben glikoproteinek. Koncentrációjuk olyan patofiziológias folyamatok során, mint a gyulladások, hormonváltozások és a daganatos megbetegedések többszörösére emelkedhet. A humán szérumban α 1-savanyú glikoprotein (AGP) olyan akut fázis fehérje, amely jelentős mennyiségben tartalmaz elágazó láncú, ún. antennáris szerkezetű oligoszacharidokat. Értekezésemben az AGP oligoszacharid-szerkezetében daganatos megbetegedések (ovárium daganatos, limfóma) esetén bekövetkező változásokat vizsgáltam, korszerű analitikai módszerek alkalmazásával.

Doktori munkám során célom az AGP humán szérumból történő biokompatibilis preparatív előállítására és tisztítására volt. Olyan nagy tisztaságú, intakt AGP mintákat igyekeztem előállítani, amelyek megfelelőek az analitikai és szerkezetvizsgálati módszerek számára.

Kísérleteimben a humán szérumban AGP szialinsav-tartalmát határoztam meg. Az analízis során arra kerestem a választ, hogy kimutatható-e változás a szialinsav relatív mennyiségében daganatos megbetegedések esetén.

Az AGP-oligoszacharidok tanulmányozása céljából azokat enzimatisz hidrolízissel szabadítottam fel a glikoproteinekből. Az oligoszacharidok folyadék-kromatográfias analízisével azok elágazás szerinti arányát kívántam meghatározni egészséges, ovárium tumoros és limfómás egyének mintáiban.

Egyedi oligoszacharid mintákat kívántam előállítani MALDI-TOF tömegspektrometriás vizsgálatok számára. Ezek szintén az oligoszacharidok szerkezetében daganatos megbetegedések hatására bekövetkező változások felderítésére irányultak.

A glikánoknak a peptidlánchoz való kapcsolódási hely szerinti vizsgálata céljából az AGP peptid és glikopeptid fragmenseit állítottam elő enzimatikus hidrolízissel. Az elegy folyadékkromatográfiás és tömegspektrometriás vizsgálatával a kapcsolódó oligoszacharid-szerkezetek jellegzetességeit igyekeztük feltérképezni.

2. Módszerek

Az AGP humán szérumból történő kinyerését folyadék/folyadék extrakcióval és a vizes fázis etanollal történő kicsapásával valósítottam meg. A glikoprotein tisztítása ioncserélő, festék ligandum affinitáskromatográfiás és gélkromatográfiás módszerrel történt. A mikropreparatív eljárásokhoz FPLC típusú középnyomású folyadékkromatográfot (Pump-500, LCC-501 Plus Controller, Single path monitor UV-1, Pharmacia), valamint Jasco HPLC készüléket (PU-980 pumpa, LG-980-02 gradienskeverő) és HP 1084B UV-detektort alkalmaztam. Az AGP minták azonosítása és tisztaságvizsgálata SDS-PAGE gélelektroforézissel történt, Protean II™ (Bio-Rad) készülék segítségével. A minták minőségét MALDI-TOF tömegspektrometriás módszerrel is ellenőriztük. A tisztított vizsgálati minták AGP-tartalmát UV spektrofotometriával, Hitachi U-2000 készüléken határoztam meg.

Az AGP minták szíálsav-tartalmának meghatározása savas hidrolízissel és származékképzést követően fordított fázisú (RP-)HPLC módszerrel, fluoreszcenciás detektálással történt. Az analízist Merck-Hitachi típusú HPLC-készüléken (L-6200 Pump, AS-2000A Autosampler, D-2500 Chromato-Integrator), valamint Jasco FP-1520 fluoreszcenciás detektor alkalmazásával végeztem.

Az AGP-oligoszacharidok előállítása a fehérje protein N-glikozidáz F (PNG-áz F) enzimmel történő hidrolízisével valósult meg. A peptidrészt etanolos kicsapással távolítottam el. Az oligoszacharidok tisztítását gélkromatográfiás oszlopon végeztem.

Az oligoszacharid minták analízise származékképzést követően normál fázisú (NP-)HPLC módszerrel, fluoreszcenciás detektálást alkalmazva történt. Az eredmények

szignifikanciájának vizsgálata nemparaméteres Kruskal-Wallis teszttel és post hoc Dunnteszttel történt (GraphPad InStat 3.06 szoftver).

A tömegspektrometriás célokra az AGP-oligoszacharidok antranilsavszármazékait állítottam elő. A mintákat a származékképző szer feleslegétől és az egyéb szennyezésektől gélkromatográfiás módszerrel tisztítottam meg.

Az AGP fehérjeláncának hidrolízise tripszin enzim alkalmazásával történt. Az elegyet ultraszűrőssel és szilárd fázisú extrakcióval tisztítottam és koncentráltam. Az emésztési terméket RP-HPLC módszerrel ISCO gyártmányú készüléken (2350 pumpa, 2360 gradienskeverő, V⁴ UV-detektor) frakcionáltam.

Az AGP és oligoszacharid minták MALDI-TOF, valamint a tripszines emésztési termék HPLC-MS tömegspektrometriás vizsgálatát az MTA Kémiai Kutatóközpont Tömegspektrometriai Osztályának munkatársai végezték.

3. Tézisek

1. Az AGP humán szérumból való előállítására kíméletes és szelektív mintaelőkészítési módszereket alkalmaztam. Az eljárás magában foglalta a glikoprotein folyadék/folyadék fázisú extrakcióját, etanolos kicsapást, ioncserélő kromatográfiát, festék ligandum affinitás- és gélkromatográfiás tisztítását. A kíméletesség szempontjából fontos szerepet töltött be a fehérjének etanollal történő kicsapása és festék ligandum affinitáskromatográfiás tisztítása. A folyamatsor végén sikerült olyan szennyezésmentes AGP mintákat előállítani, amelyek alkalmasak voltak a HPLC analitikai és tömegspektrometriás vizsgálatokra.
2. Kísérleteim során RP-HPLC módszerrel határoztam meg az AGP oligoszacharidok láncvégein található szialsav mennyiségét. Eredményeim szerint az ovárium daganatos mintákban 20 %-kal ($p < 0,05$), a limfómás minták esetén pedig 35 %-kal ($p < 0,01$) növekedett a szialsav mennyisége az egészséges kontrol mintákhoz képest. Ez arra utal, hogy a nagyobb szialsavtartalmú, tehát nagyobb elágazásszámú (tri- és tetraantennáris) szerkezetek aránya növekedett a kóros mintákban.

3. Az AGP oligoszacharidok tanulmányozása céljából megvalósítottam a fehérje PNGáz F enzimmel történő emésztését, amely során a glikoproteinről lehasított glikánok frakcióját nyertem ki megfelelő mintaelőkészítés után a további analitikai és tömegspektrometriás vizsgálatok számára.
4. A humán szérum AGP-ből enzimatis úton előállított glikánok antranilsav-származékait NP-HPLC módszerrel választottam el. Eredményeim szerint az elágazások száma szerinti (egy, illetve két szíalsavval rendelkező) bi-, valamint tri- és tetraantennáris oligoszacharidokat detektáltam. Az adatok szerint az egészséges és kóros minták között a négy szíalsavat tartalmazó, tetraantennáris frakció mennyiségében mutatkozott számottevő különbség, ami az ovárium daganatos csoportnál 35 %-os ($p < 0,01$), a limfómás egyének esetén 45 %-os ($p < 0,001$) növekedést jelentett a kontrol mintákhoz képest. A frakciók igazolása megfelelő mintaelőkészítés után MALDI-TOF tömegspektrometriás analízissel, valamint oligoszacharid standardok injektálásával retenciós idő alapján történt.
5. Nagyszámú egyedi oligoszacharid mintát állítottam elő egészséges, ovárium daganatos és limfómás egyének szérum AGP frakciójából MALDI-TOF tömegspektrometriás vizsgálatok számára. A glikánokat PNG-áz F enzimmel hasítottam le, az oligoszacharidok elegyét pedig gélkromatográfiával tisztítottam. A tömegspektrometriás vizsgálat érzékenységét antranilsavval történő származékképzéssel növeltem, amelyet újabb gélkromatográfiás tisztítás követett. Az egyedi minták MALDI-TOF analízise során megfigyelhető volt, hogy a nagyobb elágazásszámú tetraantennáris és a fukózt tartalmazó molekulák aránya magasabb volt a kóros minták esetén az egészséges egyénekével összehasonlítva.
6. Munkám során az oligoszacharidoknak a fehérjelánchoz való kapcsolódási helye szerinti vizsgálata céljából megvalósítottam a humán szérum AGP tripszines emésztését és a termék ultraszűréssel és szilárd fázisú extrakcióval történő tisztítását.
7. A hidrolizátum komponenseit RP-HPLC módszerrel fracionáltam. A glikopeptid-tartalmú frakciók azonosítása, PNG-áz F emésztésüket követően oligoszacharid-tartalmuk szerint, NP-HPLC módszerrel történt. Az eljárás kiindulópontul szolgált a peptidkeverék HPLC-MS vizsgálatának kidolgozásában.

4. Következtetések

Doktori munkám során a humán szérumból $\alpha 1$ -savanyú glikoprotein oligoszacharid-szerkezetét tanulmányoztam analitikai módszerekkel. Az AGP szérumból való kíméletes, biokompatibilis kinyerése és megfelelő mintaelőkészítése alapvető feltétele volt a vizsgálatok sikerességének. Módszertani szempontból fontos volt a lágy ionizációs technikával nehezebben ionizálható szénhidrátok származékképzés útján történő tömegspektrometriás vizsgálata.

Kísérleteim során olyan jellegzetes eltéréseket tapasztaltam a humán szérumból AGP glikánszerkezetében a daganatos megbetegedések esetén, amelyek további diagnosztikai eljárások kifejlesztésének alapját képezhetik.

5. Közlemények

A tézisek alapjául szolgáló közlemények:

1. Kremmer T, Szöllösi É, Boldizsár M, Vincze B, Ludányi K, Imre T, Schlosser G, Vékey K: Liquid chromatographic and mass spectrometric analysis of human serum acid alpha-1-glycoprotein. *Biomed. Chrom.*, **2004**, 18, 323-329
2. Szöllösi É, Kremmer T, Ludányi K, Imre T, Schlosser G, Boldizsár M, Vincze B, Vékey K: A novel method for the separation and purification of human serum acid alpha-1-glycoprotein. Liquid chromatographic and mass spectrometric investigation of tryptic fragments. *Chromatogr.*, **2004**, Suppl. 60, 213-219

A dolgozat témájában megjelent további publikáció:

1. Imre T, Schlosser G, Pocsfalvi G, Siciliano R, Molnár-Szöllösi É, Kremmer T, Malorni A, Vékey K: Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography – electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **2005**, 40, 1472-1483

Előadások, poszterek:

1. T. Imre, K. Héberger, L. Drahos, T. Kremmer, É. Szöllösi, G. Pócsfalvi, K. Vékey: Mass spectrometric and statistical analysis of N-glycans of human serum alpha-1-acid glycoprotein from cancer patients and healthy individuals. *Conferentia Chemometrica 2007*, Budapest, 2-5th September, **2007**.
2. É. Molnár-Szöllösi, T. Imre, T. Kremmer, B. Vincze, K. Vékey, A. Rosta, T. Pulay, T. Schneider: Functional proteomics of human serum alpha-1-acid glycoprotein. *19th Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR 2006)*, Budapest, Hungary, 1-4th July, **2006**.
3. Molnár-Szöllösi Éva, Imre Tímea, Pulay Tamás, Rosta András, Schneider Tamás, Vékey Károly, Kremmer Tibor: A humán szérum savanyú α 1-glikoprotein oligoszacharid szerkezetének vizsgálata daganatos megbetegedésekben, *Magyar Onkológusok Társaságának XXVI. Kongresszusa*, Budapest, **2005**. november 3-5.
4. Molnár-Szöllösi Éva, Imre Tímea, Ludányi Krisztina, Vékey Károly, Kremmer Tibor: Humán szérum savanyú α 1-glikoprotein szerkezeti mikroheterogenitásának vizsgálata, *MKE „Vegyészkonferencia 2005”*, Hajdúszoboszló, **2005**. június 28-30.
5. Imre T., Ludányi K., Molnárné Szöllösi É., Kremmer T., Pócsfalvi G., Malorni A., Vékey K.: Humán szérum alfa-1-savas glikoprotein (AGP) glikozilációs pozícióinak felderítése RP capLC-Qtof MS technikával, *METT Elválasztástudományi Vándorgyűlés*, Hévíz, **2004**. szeptember 22-24.
6. Molnár-Szöllösi É., Imre T., Ludányi K., Kremmer T., Vékey K.: Humán szérum savanyú α 1-glikoprotein oligoszacharid-tartalmának elválasztása és vizsgálata daganatos megbetegedésekben, *METT Elválasztástudományi Vándorgyűlés*, Hévíz, **2004**. szeptember 22-24.
7. Imre Tímea, Ludányi Krisztina, Kremmer Tibor, Molnárné Szöllösi Éva, Vékey Károly: A humán szérum alfa-1-savas glikoprotein oligoszacharidjainak MALDI-MS vizsgálata, *Analitikai Vegyészkonferencia*, Balatonföldvár, **2004**. június 30. – július 2.

8. Tímea Imre, Krisztina Ludányi, Tibor Kremmer, Éva Szöllösi, Károly Vékey: MALDI-TOF MS investigation of the oligosaccharide content of human serum alpha-1-acid-glycoprotein, *22nd Informal Meeting on Mass Spectrometry*; Tokaj, Hungary, 2-6th May, **2004**.
9. Imre Tímea, Ludányi Krisztina, Kremmer Tibor, Molnárné Szöllösi Éva, Vékey Károly: Humán szérum AGP tömegspektrometriás vizsgálata, „Tömeg és molekula spektroszkópia alkalmazási lehetőségei az orvosi diagnosztikában” *Szakmai Szeminárium*, MTA Kémiai Kutatóközpont, **2004**. április 14.
10. Kremmer Tibor, Vincze Borbála, Vékey Károly, Molnárné Szöllösi Éva, Ludányi Krisztina, Édesné Boldizsár Mariann, Imre Tímea, Mező Gábor, Csuka Orsolya, Gaál Dezső: Target specifikus peptidok és antimetabolit enziminhibitor konjugátumok előállítása és daganatellenes hatásának vizsgálata. Humán szérum savanyú alfa-1-glikoprotein (AGP) szerkezetének és marker jellegének vizsgálata. *III. Medicchem Konferencia*, MTA Kémiai Kutatóközpont, Budapest, **2004**. március 19.
11. T. Kremmer, M. É. Szöllösi, B. Vincze, M. Boldizsár, K. Ludányi, K. Vékey, T. Imre, G. Schlosser: RP-HPLC and Mass Spectrometry of Tryptic Fragments Derived from Human Serum AGP. *5th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods*, Siófok, 3-5th September, **2003**.
12. Tímea Imre, Krisztina Ludányi, Gitta Schlosser, Tibor Kremmer, Éva Szöllösi, Károly Vékey: Investigation of oligosaccharides of human serum alpha-1-acid-glycoprotein by MALDI-TOF MS, *21st Informal Meeting on Mass Spectrometry*, Antwerp, 11-15th May, **2003**.
13. Imre Tímea, Ludányi Krisztina, Schlosser Gitta, Kremmer Tibor, Szöllösi Éva, Vékey Károly: Human szérum AGP tömegspektrometriás vizsgálata. *MTA Peptidkémiai Munkabizottság és Nukleotidkémiai Munkabizottsági együttes tudományos ülése*, Balatonszemes, **2003**. május 26-28.

14. Molnárné Szöllősi É., Ludányi K., Vékey K., Farkas R., Édesné Boldizsár M., Vincze B., Kremmer T.: Folyadékromatográfiai módszerek alkalmazása a mono- és oligoszacharidok analízisében, *METT Elvásztástudományi Vándorgyűlés*, Lillafüred, **2002.** október 16-18.
15. Szöllősi Éva, Kremmer Tibor, Dibó Gábor: A kapilláris izoelektromos fókuszálás alkalmazása glikoproteinek jellemzésére, *MTA Peptidkémiai Munkabizottsági Ülés*, Balatonszemes, **2001.** május 22.