

Vérplazma fehérjék glikozilációjának vizsgálata

Doktori tézisek

Dr. Tóth Eszter

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Vékey Károly DSc, osztályvezető

Hivatalos bírálók: Dalmadiné dr. Kiss Borbála PhD,
tudományos munkatárs
Dr. Takátsy Anikó PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás DSc, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szökő Éva DSc, egyetemi tanár
Dr. Lelik László CSc, egyetemi docens

Budapest
2016

Bevezetés

A proteom a szervezet teljes fehérjeállományát jelenti. A proteomika a fehérjék szerkezetének és funkcióinak megismerésével foglalkozó tudományterület. Elsődleges feladata a fehérjék azonosítása és mennyiségi meghatározása. Ezen túlmenően, ide tartozik fehérjék egymással és környezetükkel (szénhidrátokkal, lipidekkel, nukleinsavakkal, gyógyszerekkel) való kölcsönhatásainak felderítése, fehérjék módosulatainak vizsgálata, az egyes fehérjék térbeli eloszlásának meghatározása és a különböző élettani és patológiai folyamatok mechanizmusának megismerése is.

A fehérjék sokféleségének kialakításában és a folyamatos változások fenntartásában, valamint a fehérjék egyedi és speciális szerepének betöltésében a poszt-transzlációs módosulatoknak kiemelkedő szerepük van. A glikoziláció emlősök esetén az egyik leggyakoribb poszt-transzlációs módosulás, és a fehérjék több, mint felénél előfordul. A fehérjék glikozilációjának szerkezeti jellemzésével és funkciójának meghatározásával a glikoproteomika foglalkozik. A glikoziláció során a fehérjék peptid láncának bizonyos aminosavaihoz különböző oligoszacharid szerkezetek (glikánok) kötődnek. Azokat az aminosavakat, ahova az oligoszacharidok kötődnek, glikozilációs helyeknek nevezzük. Egy adott glikozilációs helyhez ugyanazon fehérje esetében különböző glikánok kötődhetnek, ezt a jelenséget hívják mikroheterogenitásnak és ennek eredményeképpen jönnek létre a különböző glikoformok.

A glikoziláció fontos szerepet játszik a fehérjék végső térszerkezetének és szerkezeti stabilitásának kialakításában, a sejtek közötti kölcsönhatásokban és kommunikációban (sejtdhézió, endocitózis, molekuláris felismerés), különböző fehérje-fehérje és fehérjék más molekulákkal való kölcsönhatásaiban (receptor aktiváció), az immunválaszban pedig antigén szerepet tölt be. A glikoziláció befolyásolja a terápiában alkalmazott fehérjék hatásmechanizmusát, farmakokinetikai tulajdonságait és stabilitását is. Emellett a glikoproteinek biomarkerként is jól használhatók, azaz a diagnosztikában alkalmasak lehetnek egészséges és beteg csoportok elkülönítésére.

A különböző sejtekben, szövetekben, illetve szervekben található fehérjék azonosítása, és a fehérjék speciális tulajdonságainak, köztük poszt-transzlációs módosulatainak meghatározása nagyon összetett feladat. A vizsgálatok több tudományterület: a biokémia, molekuláris biológia, elválasztástechnika, analitikai kémia és a bioinformatika szoros együttműködését és folyamatos fejlesztését igénylik.

A glikoproteinek vizsgálata napjainkban még nem rutinszerű, és szükség van megfelelő technikák kidolgozására, illetve a már meglévő módszerek folyamatos továbbfejlesztésére és speciális alkalmazására. A vérplazmában található proteinek sokfélesége rendkívüli. Ezen túlmenően, az egyes fehérjék, illetve az ezekhez tartozó különböző glikoformok koncentrációiban is több nagyságrendnyi különbségek vannak. Mindezek miatt a vérplazma fehérjék glikozilációs mintázatának meghatározása különösen nagy kihívást jelent. A minták komplexitásának csökkentése elengedhetetlen, ezért az analízist a legmodernebb analitikai technikák, így a tömegspektrometria esetében is többdimenziós elválasztási lépések előzik meg.

Célkitűzés

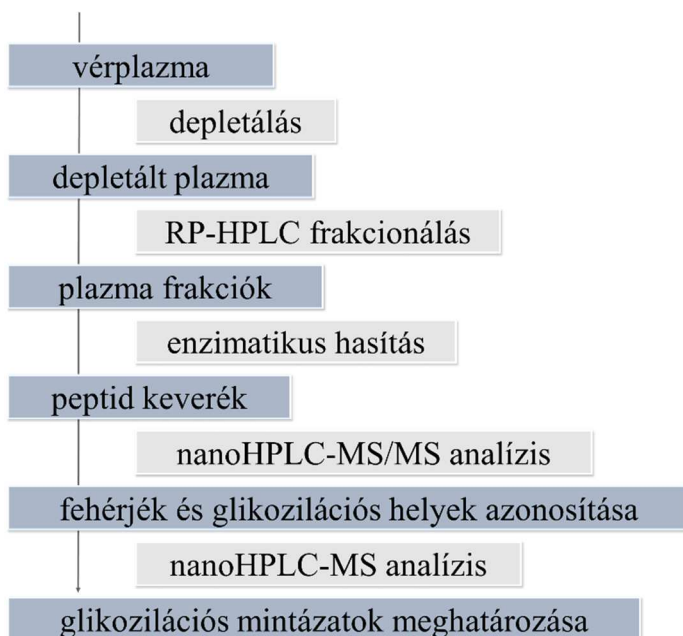
Doktori munkám során céлом volt a vérplazma fehérjék helyspecifikus glikozilációs mintázatának meghatározása.

Az első lépés a plazma fehérjék glikozilációs mintázatának meghatározására alkalmas módszer kifejlesztése és optimalálása volt. Ennek érdekében céлом volt: a vérplazma minták komplexitásának csökkentésére szolgáló depletálásból és frakcionálásból álló módszer kidolgozása; valamint az ezt követő nano-HPLC-MS(/MS) mérések optimalálása és reprodukálhatóságának javítása.

A módszerek kidolgozását és optimalálását követően több fehérje helyspecifikus glikozilációs mintázatát szerettem volna meghatározni, először egészséges emberek-, majd sugárterápiával kezelt betegek mintáiban. Céлом volt az ionizáló sugárzás glikozilációra való hatását megvizsgálni és az esetleges változásokat azonosítani.

Módszerek

Vérplazma fehérjék helyspecifikus glikozilációs mintázatának meghatározására egy több lépésből álló minta-előkészítési, analitikai és értékelési módszert dolgoztam ki, optimaltam és alkalmaztam. A teljes folyamat az alábbi ábrán látható:



A plazmából az albumin és immunglobulin G fehérjéket affinitás kromatográfiával, előtöltött oszlopon távolítottam el manuális elúcióval. Az így kapott depletált plazmát analitikai méretű fordított fázisú kromatográfiás oszlopon HPLC készülék és UV-detektálás segítségével frakciókra szedtem szét. Az egyes frakciókban található fehérjéket redukáltam, alkiláltam és tripszines emésztéssel peptidekre és glikopeptidekre bontottam. A peptid keverékek összetételét nano-HPLC-MS(/MS) módszerrel vizsgáltam. A frakciók fehérjetartalmának meghatározása céljából adatfüggő MS/MS méréseket végeztem, így ciklusonként egy teljes MS spektrumot és a három legintenzívebb ion MS/MS spektrumából álló adatsort vettem fel. A glikozilációs helyek és a főbb glikoformok azonosítására ettől eltérő műszerbeállítás mellett (nagyobb tömegtartományban és alacsonyabb ütközési energián) felvett adatfüggő MS/MS méréseket végeztem. A kis koncentrációjú glikoformok azonosítását és az összes glikoform kvantitatív meghatározását kiterjesztett dinamikus tartományú MS mérésekkel valósítottam meg.

A mérési adatok értékelését több, részben kereskedelmi, részben pedig a kutatócsoportban fejlesztett szoftver alkalmazásával végeztem el. A frakciók

fehérjetartalmának azonosítása ProteinLynx Global Server, Mascot Server és SwissProt humán fehérje szekvencia adatbázis alkalmazásával történt. A glikozilációs helyek és az intenzívebb glikoformok azonosítását a GlycoMiner szoftver segítségével és manuális értékeléssel végeztem. A kisebb intenzitású glikoformok azonosítása során a glikoformokhoz tartozó m/z értékeket manuálisan kerestem le az MS spektrumokban. Csak azokat a glikoformokat fogadtam el valósnak, amelyek töltése, izotópeloszlása és HPLC retenciós ideje a vártnak megfelelő volt. A nem egyértelműen azonosítható glikoformok esetében a kiválasztott komponensekből egyedi MS/MS spektrumokat vettem fel, és ezek értékelésével azonosítottam a glikoformokat.

A glikoformok intenzitását (relatív koncentrációját) a GlycoPattern szoftver segítségével határoztam meg. A programot a további méréseknél nem csak az intenzitás értékek meghatározására, hanem a glikoformok azonosítására is felhasználtam. A lehető legtöbb valós glikopeptid azonosítása és a hamis találatok kiszűrése érdekében optimaltam a keresési paraméterkészletet, majd ezt követően az értékelést részben automatizáltam.

Eredmények

(1) A vizsgálatokat zavaró fehérjék eltávolítására, majd a vérplazma ezt követő fordított fázisú kromatográfiával történő frakcionálására szolgáló minta-előkészítési módszert dolgoztam ki és optimaltam. Igazoltam, hogy ez a módszer nagymértékben csökkenti a vérplazma minták komplexitását, lehetővé téve nem csak az egyes fehérjék, hanem a különböző kis koncentrációban jelenlévő glikoformok analízisét is. A módszer alkalmas a fehérjék részletes, helyspecifikus glikozilációs mintázatának meghatározására. Ezenkívül igazoltam, hogy az analitikai célra szolgáló (4,6 illetve 2,1 mm átmérőjű) HPLC oszlopokkal olyan mennyiségű fehérje izolátum állítható elő, amely elegendő számos plazma fehérje glikozilációs mintázatának meghatározására. [1]

(2) Igazoltam, hogy az egyes fehérjék különböző glikoformjai a kidolgozott, fordított fázisú HPLC frakcionálás során számottevően nem válnak el egymástól. Ennek eredményeképpen egy fehérje glikozilációs mintázata meghatározható egy frakcióból. Megállapítottam továbbá, hogy a fordított fázisú tölteten keresztül történő áthaladás a glikozilációs mintázatokat nem torzítja, azaz a glikoformok eloszlását nem változtatja meg. Ez nagyban eltér a fehérje izolálásra szolgáló számos más módszerektől, amelyek a glikoformokat egymástól elválasztják, így nagymértékben nehezítik a glikozilációs mintázatok meghatározását. [1]

(3) Egyszerű statisztikai módszerek alkalmazásával jellemeztem több napon át tartó nano-HPLC-MS mérésorozatok reprodukálhatóságát. Megállapítottam, hogy a szórás jelentős mértékben függ az adott komponens intenzitásától, és a kimutatási határ közelében levő komponensek esetén jelentősen megnő. Ezenkívül megállapítottam, hogy nano-HPLC esetén a reprodukálhatóság (a HPLC-MS-nél megszokottnál) lényegesen rosszabb, intenzív csúcsok esetén is 15% körüli érték. A vizsgálatok azt mutatták, hogy a rossz reprodukálhatóságot nem csak véletlen szórás okozza, hanem az egyes csúcsok intenzitása az időben (több nap alatt) jelentősen megváltozik. Kimutattam, hogy különböző komponensek intenzitása az időben különböző mértékben (és különböző irányban) változik. [2]

(4) Megállapítottam, hogy az ion intenzitások több nap alatt bekövetkező változását jól le lehet írni egy negyedfokú polinommal. Módszert dolgoztam ki az így leírt időbeli változás korrigálására. Megállapítottam, hogy ennek a módszernek az alkalmazásával (a dolgozatban bemutatott példa esetén) a szórást 15%-ról 8%-ra lehetett csökkenteni. A

korrekció nem csak a mérések reprodukálhatóságát növeli, hanem az időfüggésből származó szisztematikus hibákat is csökkenti. [2]

(5) A minta-előkészítési, mérési és értékelési módszerek optimalizálását követően meghatároztam a nagyobb koncentrációjú vérplazma fehérjék helyspecifikus glikozilációs mintázatát. Ezek több esetben részletesebbek voltak, mint az irodalomban megtalálható mintázatok, pedig szigorúbb elfogadási követelményeket alkalmaztam. Olyan fehérjék glikoformjait is sikerült azonosítanom, amelyek helyspecifikus mintázatát az irodalomban nem találtam meg. A vérplazma fehérjéken azonosított glikoformok száma eléri a nagy mennyiségben hozzáférhető, tisztított standard fehérjék esetén azonosított glikoformok számát, ami azt jelenti, hogy fehérje szinten történő további tisztítási vagy izolálási lépések beiktatása már nem szükséges.

(6) Elsőként tanulmányoztam az ionizáló sugárzás glikozilációra való hatását humán vizsgálatban, vérplazma fehérjéken. Radioterápiás sugárkezelést megelőző, a kezelés során, valamint a kezelés befejezését 1-1,5 hónappal követően vett vérplazma mintákból meghatároztam 7 fehérje helyspecifikus glikozilációs mintázatát. Megállapítottam, hogy a sugárkezelés mind a fehérjék koncentrációját, mind pedig a glikozilációs mintázatokat megváltoztatja. [3]

(7) Megállapítottam, hogy a glikozilációs mintázatokban bekövetkező változások a sugárkezelést követően hosszú ideig fennmaradnak. A sugárkezelés során indukált változások nagy része a kezelés befejezését követően 1-1,5 hónappal még fennállt, bár mértékük kisebb volt, mint a besugárzás során. Ez azt jelenti, hogy a kezelést követően a glikoziláció hosszú időre megváltozik. A fehérjék glikozilációja lassan visszatér a besugárzás előtti állapotba, de ez több hónapig is eltarthat. [3]

Következtetések

Vizsgálataim megerősítik azt a feltételezést, hogy a fehérjék fordított fázisú elválasztásában a peptidlánc tulajdonságainak van a legnagyobb szerepe, és a glikoziláció kevés befolyással van arra. Ennek nagy előnye, hogy a fordított fázisú frakcionálás lehetővé teszi a glikozilációs mintázatok egy frakcióból történő meghatározását. Ez valószínűleg nem csak a glikoziláció, hanem más poszt-transzlációs módosulásokra is igaz. Kezdeti eredményeim ezt igazolják foszforiláció esetén is, bár részletes vizsgálatokat csak a glikozilációra végeztem.

A negyedfokú polinom illesztésén alapuló korrekciós módszer nagymértékben csökkenti a tömegspektrometriai mérések szórását. A módszert teljesen azonos és egymástól kismértékben különböző minták esetén is teszteltem, ahol kismértékű különbségeket kellett meghatározni. A polinomiális korrekció általánosan használható hosszú időtartamú méréssorozatok esetén, így azt várjuk, hogy széleskörűen el fog terjedni. A módszer iránt a gyógyszeripar részéről is érdeklődés mutatkozik.

Az általunk vizsgált vérplazma fehérjék helyspecifikus glikozilációs mintázata az irodalomban talált mintázatoknál részletesebb, néhány esetben teljesen újnak tekinthető. Az újonnan azonosított glikoformok közelebb vihetnek a fehérjék biológiai jelentőségének alaposabb megismeréséhez és működésük mélyebb megértéséhez. Az így azonosított glikoformok különböző betegségekben történő vizsgálata új, vagy a korábbiaknál szelektívebb biomarkereket eredményezhet. Laboratóriumunkban a kutatást ilyen irányban terjesztjük ki.

Az ionizáló sugárzás a glikozilációt több fehérje esetén is befolyásolja, és ezek a változások hosszú távon fennállnak. Mivel a glikoziláció számos immunológiai folyamat és a sejtek közötti kommunikáció lényeges eleme, az így kimutatott változások a sugárterápiás kezelés hatékonyságát, illetve mellékhatásait is jelentősen befolyásolhatják. Ennek orvosbiológiai következményeit lengyel kollégáink tanulmányozzák.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények

[1] **Toth E**, Ozohanics O, Bobaly B, Gomory A, Jeko A, Drahos L and Vekey K. (2014) HPLC enrichment/isolation of proteins for post-translational modification studies from complex mixtures. J Pharm Biomed Anal, 98:393-400.

IF (2014): 2,979

10.1016/j.jpba.2014.06.025

[2] **Toth E**, Hever H, Ozohanics O, Telekes A, Vekey K and Drahos L. (2015) Simple correction improving long-term reproducibility of HPLC–MS. J Mass Spectrom, 50:1130-1135.

IF (2014): 2,379

10.1002/jms.3629

[3] **Toth E**, Vekey K, Ozohanics O, Jeko A, Dominczyk I, Widlak P and Drahos L. (2016) Changes of protein glycosylation in the course of radiotherapy. J Pharm Biomed Anal, 118:380-386.

IF (2014): 2,979

10.1016/j.jpba.2015.11.010

Egyéb közlemények

Vekey K, Ozohanics O, **Toth E**, Jeko A, Revesz A, Krenyacz J and Drahos L. (2013) Fragmentation characteristics of glycopeptides. *Int J Mass Spectrom*, 345-347:71-79.

IF (2013): 2,227

10.1016/j.ijms.2012.08.031

Bobaly B, **Toth E**, Drahos L, Zsila F, Visy J, Fekete J and Vekey K. (2014) Influence of acid-induced conformational variability on protein separation in reversed phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 1325:155-162.

IF (2014): 4,169

10.1016/j.chroma.2013.12.022

Krajsovsky G, **Toth E** and Ludanyi K. (2014) Tandem mass spectrometric study of annelation isomers of the novel thieno[3',2':4,5]pyrido[2,3-d]pyridazine ring system. *ARKIVOC*, 5:158-169.

IF (2014): 1,165

10.3998/ark.5550190.0015.500