Az alfa-1 savas glikoprotein - mint biomarker - izoformjainak HPLC-MS analízise

Doktori értekezés

Budai Lívia

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Vékey Károly osztályvezető, DSc.

Hivatalos bírálók: Dr. Mincsovics Emil címzetes egyetemi docens, PhD
Dr. Jekő József főiskolai adjunktus, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Mátyus Péter egyetemi tanár, DSc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Zelkó Romána egyetemi tanár, DSc.
Dr. Márk László egyetemi adjunktus, PhD.

Budapest
2010

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK 2
Rövidítések jegyzéke 4
I. BEVEZETÉS 6
I. 1. Az alfa-1 savas glikoprotein (AGP) 6
I. 1. 1. Az AGP biológiai funkciói 7
I. 2. Az AGP izoformok 8
I. 2. 1. Az AGP genetikai variánsai 9
I. 2. 1. 1. Az AGP genetikai variánsainak elnevezése 9
I. 2. 1. 2. Az AGP genetikai variánsai patológiás állapotokban 10
I. 2. 1. 3. A genetikai variánsok jelentősége a klinikai farmakológiában 13
I. 2. 2. Az AGP glikozilációja 14
I. 2. 2. 1. Az AGP oligoszacharidok elnevezése 14
I. 2. 2. 2. Az AGP glikánok izoformjai 16
I. 2. 2. 3. Az AGP izoformok patológiás állapotokban 17
I. 3. Tömegspektrometria a proteomikában és glikoproteomikában 19
I. 3. 1. Tömegspektrometria 19
I. 3. 2. Proteomikában alkalmazott tömegspektrometriás módszerek 22
I. 3. 3. Glikomikai kutatások tömegspektrometriával 25
I. 3. 4. Folyadékkromatográfia alkalmazása az oligoszacharidok HPLC-MS vizsgálatában 27
I. 3. 5. Oligoszacharidok tandem MS fragmentációja 31
II. CÉLKITŰZÉSEK 34
III. MÓDSZEREK 35
III. 1. Az AGP peptidek analízisére alkalmazott módszerek 35
III. 1. 1. Anyagok, eszközök 35
III. 1. 2. Humán AGP minták 36
III. 1. 3. Az AGP peptidekre hasítása tripszines emésztéssel 36
III. 1. 4. Az AGP peptidek HPLC-MS analízise 38
III. 2. Módszerfejlesztés az oligoszacharidok analízisére 40
III. 2. 1. Anyagok, eszközök 40
III. 2. 2. Az oligoszacharidok hasítására alkalmazott módszer fejlesztése 41
III. 2. 3. Az oligoszacharidok tisztítása 42
III. 2. 4. Az oligoszacharidok folyadékkromatográfiás analízise 44
III. 3. Az oligoszacharidok analízisére kidolgozott módszer 50
III. 3. 1. Oligoszacharidok mintaelőkészítése 50
III. 3. 2. Oligoszacharidok PGC-MS analízise 51
IV. EREDMÉNYEK 53
IV. 1. Genetikai variánsok vizsgálata 53
IV. 1. 1. Peptidek azonosítása tömegspektrometriával 54
IV. 1. 2. A genetikai variánsok arányának meghatározása 55
IV. 1. 3. Az egészséges egyének és daganatos betegek adatai 59
IV. 2. Oligoszacharidok analízisének eredményei 62
IV. 2. 1. Tömegspektrometriás analízis, kapcsolt technikák nélkül 62
IV. 2. 2. Fordított fázisú HPLC-MS módszer az oligoszacharidok analízisére 65

IV. 2. 3. Oligoszacharidok analízise grafitoszloppal kapcsolt tömegspektrometriával 66
IV. 2. 4. Az oligoszacharidok fragmentációja 71
IV. 2. 4. 1. Grafitoszlopon elváló izoformok tandem MS analízise 77
V. MEGBESZÉLÉS 80
V. 1. Az AGP genetikai variánsainak megoszlása 80
V. 1. 1. A genetikai variánsok megoszlása az egészséges egyénekben és daganatos betegek esetében 80
V. 1. 2. Az eredmények összevetése irodalmi adatokkal 84
V. 2. Oligoszacharidok szerkezeti jellemzése 86
V. 2. 1. Folyadékkromatográfiás analízis 86
V. 2. 2. Oligoszacharidok megoszlása az AGP emésztményben 86
V. 2. 3. Oligoszacharidok retenciós ideje grafitoszlopon 89
V. 2. 4. Oligoszacharidok izoformjainak tandem MS analízise 90
VI. KÖVETKEZTETÉSEK 94
VII. ÖSSZEFOGLALÁS 96
VIII. SUMMARY 97
IX. IRODALOMJEGYZÉK 98
X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 104
X. 1. Az értekezés témájában megjelent közlemények 104
X. 1.1. Publikációk 104
X. 1.2. Előadások 104
X. 1.3. Poszterek 106
X. 2. Egyéb közlemények jegyzéke 107
XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 108

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Név
A	alanin
ACN	acetonitril
AGP	alfa-1 savas glikoprotein
Asn	aszparagin
Bi-	kétantennás oligoszacharid
C	cisztein
D	aszparaginsav
Da	dalton
DCM	diklórmentán
DTT	1,4-ditio-treitol
E	glutaminsav
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
ESI	elektrospray ionizáció
F	fenil-alanin
Fuc, F	fukóz
G	glicin
Gal	galaktóz
GlcNAc	N-acetil-glükózamin
H	hisztidin
HDL	magas denzitású lipoprotein
Hex20	20 monoszacharid egységből álló oligoszacharid
HPLC	nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
I	izoleucin
IgG	inmmunglobulin G
IgM	immunglobulin M
IL	interleukin
IPA	izopropanol
K	lizin
L	leucin
LDL	alacsony denzitású lipoprotein
M	metionin
Maldi	mátrix segített lézer deszorpció/ionizáció
Man	mannóz
Mt	molekulatömeg
MS	tömegspektometria
N	aszparagin

ORM1	az alfa-1 savas glikoprotein egyes lókuszán kódolt genetikai variánsok
ORM2	az alfa-1 savas glikoprotein kettes lókuszán kódolt genetikai variánsok
P	prolin
PAI-1	plazminogén aktivátor inhibitor 1
PGC	grafittöltetű oszlop
PNGáz F enzim	peptid-N4-(acetil-β-glükózaminil) aszparagin amidáz N-glikozidáz F enzim
Q-Tof	quadrupól és repülési idő analizátor
Q	glutamin
R	arginin
S	szerin
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
Sia, S	sziálsav
SPE	szilárd fázisú extrakció
T	treonin
Tetra-	négyantennás oligoszacharid
TFA	trifluorecetsav
THF	tetrahidrofurán
Tof	repülési idő analizátor
Tri-	háromantennás oligoszacharid
UPLC	ultranagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
V	valin
VLDL	nagyon alacsony denzitású lipoprotein
W	triptofán
Y	tirozin

I. BEVEZETÉS

I. 1. Az alfa-1 savas glikoprotein (AGP)

Az alfa-1 savas glikoprotein (AGP) a humán plazmában megtalálható, pozitív akut fázis fehérjék csoportjába tartozó glikoprotein. Fiziológiás körülmények között az AGP plazmában mért koncentrációja 0,5-1,0 mg/ml, ami tízszeresére is képes növekedni akut fázis reakciók alatt (1, 2).

Az AGP öt N-glikozilációs hellyel rendelkező glikoprotein, oligoszacharid-tartalma a glikoprotein tömegének 40 %-át is meghaladhatja (3).

Az AGP expressziója főleg a hepatocitákban történik, de extrahepatikus expresszióját is megfigyelték epithel sejtekben, alveoláris makrofágokban, endothel sejtekben és a prosztata sejtjeiben (2).

A humán AGP-t 183 aminosav építi fel, peptidláncában két diszulfid híd található. A fehérje szerkezetének 15 %-át α-hélixek, 41 %-át β-redők alkotják. Az AGP szerkezetében lévő magas β-redő arány teszi a glikoproteint molekulák szállítására alkalmas fehérjévé. Az AGP a lipokalinok családjába és az immunokalinok alcsaládjába tartozó fehérje. A lipokalinok családjába tartozó fehérjék esetében közös a molekulák szállítására irányuló funkció (1).

Az AGP-t számos irodalom biomarkerként említi (1-6). A biomarker vagy biológiai marker egy indikátor molekula, ami biológiai rendszerek állapotát jellemzi. A biomarkerek segítségével fiziológiás, patológiás folyamatok, valamint terápiás beavatkozások farmakológiai válaszreakciói jellemezhetők (1-4).

A rizikófaktor indikátor biomarker vagy prediktív biomarker egyes betegségek esetében fokozott veszélyeztetettségi állapot fennállására utalhat. A betegség manifesztálódása esetén a diagnosztikus biomarker jelezheti a megváltozott fiziológiai körülményeket. A prognosztikus biomarker individuális esetekben utalhat a betegség progrediálására (1-6).

Kutatómunkám során az AGP-t, mint diagnosztikus biomarkert vizsgáltam daganatos betegségekben szenvedők AGP mintáit analizálva.

I. 1. 1. Az AGP biológiai funkciói

A glikoprotein változatos biológiai funkciói közül a molekulakötő és -szállító képességét, valamint az immunválaszt befolyásoló szerepét érdemes kiemelni.

Az AGP az albumin és a lipoproteinek (kilomikron, VLDL, LDL, HDL) mellett az egyik legfontosabb molekulakötő és -szállító fehérje a plazmában. A plazma AGP koncentrációja az albuminéhoz képest kisebb, azonban pozitív akut fázisos reakció során az AGP koncentrációja megemelkedik, míg az albuminé – negatív akut fázis fehérjeként – csökken. Így akut fázis reakciók eredményeként az AGP válik az egyik legjelentősebb molekulakötő fehérjévé (4, 5).

Az AGP fiziológiás körülmények között több, mint 300 különböző molekula megkötésére és szállítására képes. Ligandjai között endogén és exogén molekulák is megtalálhatók (6).

Endogén ligandjaihoz tartozik a heparin, a szerotonin, a vérlemezke aktiváló faktor, a melatonin, a hisztamin és a szteroid hormonok. Az ösztradiol hét lehetséges kötőhelyen képes kapcsolódni az AGP-hez. A glikoprotein szérum fehérjékkel is interakcióba lép, a plazminogén aktivátor inhibitor 1-es típusához (PAI-1) történő kötődését írták le.

Az AGP exogén ligandjai között megtalálható a vanilloidokhoz tartozó kapszaicin, valamint bakteriális lipopoliszacharidok. Számos gyógyszermolekula glikoproteinhez történő kötődését figyelték meg. Az AGP koncentrációjának emelkedésekor a megkötött hatóanyagok plazmakoncentrációja megváltozik, így az AGP jelentősen befolyásolni képes a megkötött gyógyszermolekulák farmakokinetikáját.

Saquinavir, ritonavir és indinavir alkalmazásakor alacsonyabb proteáz inhibitor koncentrációkat mértek emelkedett AGP koncentráció esetében, így az alacsonyabb hatóanyag koncentráció miatt kisebb mértékű antivirális hatást tapasztaltak (7).

Az onkogén tirozin kináz inhibitor, az imatinib kötődését és farmakokinetikájának megváltozását figyelték meg emelkedett AGP koncentráció esetében (8).

Az AGP immunmodulációban betöltött szerepe az irodalomban gyakran ellentmondásos képet nyújt. A glikoprotein által kifejtett biológiai hatás az AGP plazmában mért koncentrációjától is függ (9-11).

Az AGP monocitákra kifejtett hatását tekintve proinflammatorikus glikoproteinnek tekinthető. Monociták indukálásával az AGP citokinek expresszióját képes kiváltani - az interleukin-6 (IL-6) és interleukin-12 (IL-12) proinflammatorikus citokinek expressziójának fokozására képes (11).

Az AGP limfocitákra gyakorolt hatását illetően azt tapasztalták, hogy képes a limfociták proliferációs válaszát befolyásolni. Az AGP koncentrációjától függően azonban a limfocitákra gyakorolt hatás különböző lehet. A fiziológiásnál alacsonyabb AGP plazmaszint esetében az AGP stimulálta a limfociták proliferációját, azonban magas AGP koncentráció a proliferációt szuppresszálta (12).

Magas, a fiziológiásnál tízszer nagyobb AGP koncentráció esetében az AGP vérlemezke aggregációt gátló hatását figyelték meg. Feltételezések szerint a magas AGP koncentrációhoz nemcsak a hepatociták által, hanem a lokálisan, azaz a granulociták által szintetizált AGP is hozzájárul (1, 9).

A glikoprotein felszínén lévő oligoszacharidok a sejtek közötti kommunikációban és adhézióban játszhatnak szerepet és befolyásolhatják a glikoprotein plazmában mért életidejét is (2).

Kérdések merülnek fel az irodalomban az AGP lehetséges kötőhelyeivel és receptoraival kapcsolatban. A glikoprotein számos és rendkívül változatos biológiai hatását publikálták, azonban számos kérdés még nyitva áll az AGP biológiai funkcióját illetően. Ahhoz, hogy megismerjük a glikoprotein szervezetben betöltött szerepét, ismernünk kell lehetséges izoformjainak szerkezetét. Az izoformok közötti szerkezetbeli eltérés adódhat a peptidlánc aminosav-szekvenciájából, illetve a glikozilációs mintázat eltéréseiből is (1, 2).

I. 2. Az AGP izoformok

Az AGP izoformjai származhatnak a glikoprotein aminosav-sorrendjének eltéréseiből, illetve a glikoprotein glikozilációs mintázatának eltéréseiből. Az eltérő aminosav-sorrendű izoformok eredményezik az AGP genetikai variánsait. A glikozilációs mintázat eltérései az oligoszacharidok szerkezetében különböző AGP

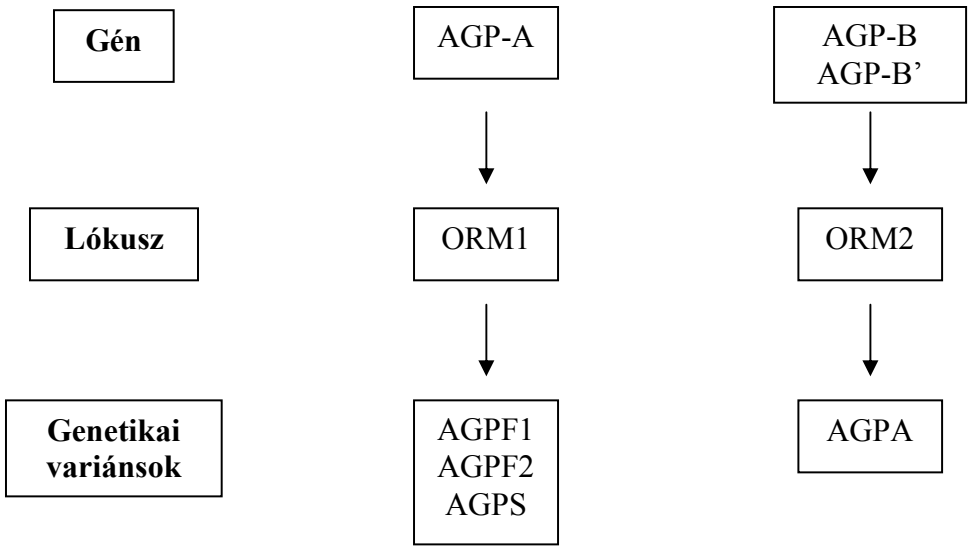
izoformok létrejöttét eredményezik. A genetikai variánsok és a glikozilációs mintázat eltéréséből fakadó AGP izoformok bemutatására az alábbi két fejezetben kerül sor.

I. 2. 1. Az AGP genetikai variánsai

I. 2. 1. 1. Az AGP genetikai variánsainak elnevezése

A humán AGP 37 kDa-os polipeptidlánccal rendelkező fehérje. Az AGP prekurzor fehérje 201 aminosavból áll. Az első 18 aminosavból álló szignálpeptid lehasad a proteinszintézis során, így 183 aminosavból álló fehérje jön létre (1, 2).

Az AGP négy genetikai variánsa azonosítható a humán plazmában: AGP F1, AGP F2, AGP S és AGP A (1. ábra). A négy genetikai variánst három, a 9-es kromoszómán elhelyezkedő gén kódolja: AGP-A, AGP-B és AGP-B'. Az AGP-A gén kódol három genetikai variánst, az AGP F1, AGP F2 és AGP S variánsokat, az ORM1 lókuszon. Az AGP-A géntől 22 bázispárban eltérő AGP-B és AGP-B' gének kódolják az ORM2 lókuszon az AGP-A variánst (1, 13).



1. ábra: Az AGP-t kódoló gének és genetikai variánsok

Az AGP három, legnagyobb mértékben expresszálódó genetikai variánsának (az AGP F1, AGP S és AGP A) svájci populációban mért megoszlását vizsgálva azt tapasztalták, hogy a populáció 50 %-ában megtalálható az AGP F1, AGP S és AGP A variáns. A populáció 35 %-ában expresszálódik az AGP F1 és AGP A és 15 %-ában az AGP S és AGP A (14, 15).

I. 2. 1. 2. Az AGP genetikai variánsai patológiás állapotokban

Irodalomban ismert tény, hogy akut fázis reakciókban, gyulladás esetén és daganatos megbetegedésekben az AGP plazmában mért koncentrációja megnő (1). Ellentmondásosak azonban az adatok arra vonatkozóan, hogy az AGP plazmaszintjének növekedéséhez egyenlő mértékben járulnak-e hozzá a két genetikai lókuszon kódolt variánsok. Egyes kutatásokban azt tapasztalták, hogy az ORM1 genetikai variánsai expresszálódnak nagyobb mértékben (16). Más kutatások azt írják le, hogy az ORM1 és ORM2 variánsok egyenlő mértékben járulnak hozzá az AGP koncentrációjának emelkedéséhez (17-19).

Eap cikkében az AGP variánsok relatív koncentrációjának változását mutatja be akut fázis reakciókat követően (16). Az AGP koncentrációja többszörösére növekedhet sebészeti beavatkozás, daganatos megbetegedés vagy gyulladás következtében. Eap 19 beteg AGP mintájában analizálta az ORM1 és ORM2 genetikai variánsok relatív megoszlását sebészeti beavatkozás előtt és után. A vizsgált betegek a sebészeti beavatkozás alatt csak saját vérüket kapták a vértranszfúzió alatt és nem kaptak idegen személytől vért, így a különböző AGP fenotípusok keveredése és az abból eredő hiba kiküszöbölhető volt. Enyhe emelkedést tapasztaltak az AGP ORM1 variánsainak relatív megoszlása esetében, így az ORM2 relatív százalékos megoszlása enyhén csökkent. A 19 fővel végrehajtott kutatásból azonban a kis mintaszám miatt statisztikai adatok nem vonhatók le. Eap arra következtetett kutatásaiból, hogy kismértékű, de szignifikáns emelkedés tapasztalható az AGP ORM1 variánsainak relatív koncentrációját illetően a sebészeti beavatkozások után. Eap hangsúlyozza cikkében, hogy az eredmények, melyek az AGP genetikai variánsainak eltérő expressziójáról tanúskodnak a klinikai farmakológia számára is hasznos információt nyújtanak. Az ORM1 és ORM2

variáns(ok) különböző gyógyszerkötési affinitással rendelkeznek, amelyek az AGP variánsai által megkötött gyógyszerek farmakokinetikáját befolyásolják. Eap az AGP genetikai variánsainak analízisét az izoelektromos fókuszálást követően, immunoblotting és lézer denzitometria segítségével határozta meg (16).

Vandijk és mtsai gyulladás indukálta esetekben vizsgálták az AGP genetikai variánsainak expresszió jában bekövetkező változásokat. Az eredményekből az derül ki, hogy mind az AGP-A, mind az AGP-B és AGP-B' gének által kódolt variánsok mennyisége megnövekedett gyulladás alatt. Vandijk megfigyelései alapján gyulladást indukáló esetekben az AGP fokozott expressziójához mind az ORM1 és az ORM2 hozzájárul és nincs kiemelt szerepe az ORM1 variánsainak akut fázis reakciókban (19).

Duché és mtsai egészséges egyénekben vizsgálták a humán AGP koncentrációját és genetikai variánsainak arányait. Az egészséges csoporton elvégzett analízis alapja lehet betegcsoportok AGP koncentrációjának analízisének és a genetikai variánsok arányaiban bekövetkező változások elemzésének. 74 egészséges önkéntes vett részt Duché tanulmányában, a csoport 42 férfiból és 32 nőből állt. Az egészséges csoport átlagéletkora 31,7 év ± 9,7 év, 20 éves legfiatalabb és 58 éves legidősebb önkéntessel. A szérumban mért AGP átlagos koncentrációja 0,5 ± 0,14 g/l. Az ORM1 variánsok aránya a plazmában mért AGP teljes mennyiségéhez viszonyítva 67,3 ± 8,5 %, az ORM2 aránya 32,7 ± 8,5 %. Kutatásaik alapján az ORM1 variánsok mennyisége minden esetben meghaladta az ORM2 variánsok mennyiségét. Az ORM1 variánsok plazmaszintje kétszeresen haladta meg az ORM2 variánsok plazmaszintjét (17).

A humán AGP koncentrációját és genetikai variánsainak arányát vizsgálták rákban szenvedő betegek esetében. A 61 főből álló rákos betegcsoportból 39 fő emlőrákban, 16 fő tüdőrákban és 6 fő petefészekrákban szenvedett. Az AGP plazmában mért koncentrációja emlőrák és tüdőrák esetében 2,5-szeresére növekedett, petefészekrák esetében 1,6-szoros emelkedést figyeltek meg az egészséges csoportban mért koncentrációkhoz képest. 6 beteg adatain kívül az ORM1 variánsok aránya minden esetben meghaladta az ORM2 variánsokét. A 6 fő átlagostól eltérő adatai a biológiai variabilitással is magyarázhatók. Duché a rákos megbetegedésben szenvedők AGP variánsainak analízise során megfigyelte mind az ORM1, mind az ORM2 variáns(ok) szintjének emelkedését. Ugyanakkor az ORM1/ORM2 arány vizsgálatakor nem észlelt szignifikáns különbséget a rákos és az egészséges betegcsoportok között. Duché azt a

következtetést vonta le kutatásaiból, hogy mind az AGP-A, mind az AGP-B és AGP-B' gének hozzájárulnak az AGP emelkedett szintű transzkripciójához daganatos betegségek esetében. A genetikai variánsok megoszlásában és annak változásában a rákos betegcsoportokban nem észlelt szignifikáns különbséget az egészséges, kontroll csoporthoz viszonyítva (17, 18).

A daganatos csoportok és az egészséges csoport esetében sem figyeltek meg statisztikailag jelentős eltérést az ORM1/ORM2 variánsok arányában.

Duché és mtsai a plazmában mért AGP koncentráció esetében 28 %-os szórást tapasztaltak az egészséges egyének esetében és 45 %-ot a rákos betegségben szenvedők körében. Az ORM1 és ORM2 arányát tekintve az adatok még nagyobb szórást mutatnak: 35 % egészséges egyének esetében és 60 % a rákos betegcsoportokban.

Duché és mtsai az AGP esetében deszializációt követően izoelektromos fókuszálással végezték vizsgálataikat. Az AGP genetikai variánsait immunoblotting módszerrel, a relatív arányukat lézer denzitometriás módszerrel határozták meg (17, 18).

Korábbi irodalom alapján egymástól eltérő kutatási eredmények rajzolódnak ki az AGP genetikai variánsainak megoszlása tekintetében akut fázis reakciókat követően. Az egyik kutatási megfigyelés alapján, Eap eredményei szerint, az AGP ORM1 genetikai variánsainak relatív koncentrációja nagyobb mértékben megemelkedik, mint az ORM2 variánsé (16). Ezzel ellentétben, Duché nem talált szignifikáns különbséget az egészséges és daganatos betegek esetében a két genetikai lókuszhoz tartozó variánsok megoszlását illetően (17, 18). Eap kutatásai során kisszámú betegmintával dolgozott, és a 19 fő adataiból nem vonhatók le statisztikailag megbízható eredmények, azonban az eredmények megbízhatóságát növeli az a tény, hogy ugyanazt a betegmintát vizsgálta az AGP szintjének emelkedését indukáló, sebészeti beavatkozás előtt és után (16). Duché nagyobb mintaszámú csoportot, 61 rákos beteg AGP mintáját analizálta, a kontroll csoportját a korábbi cikkében leírt és bemutatott eredmények alapján 74 fő jelentette (17, 18).

I. 2. 1. 3. A genetikai variánsok jelentősége a klinikai farmakológiában

Az AGP genetikai polimorfizmusát a gyógyszerhatóanyagok kötődési vizsgálatai esetében szükséges figyelembe venni. Néhány hatóanyag hasonló affinitással kötődik az AGP valamennyi genetikai variánsához, míg más hatóanyagok esetében az affinitás változását írták le a genetikai variánstól függően (20-26).

Egyes hatóanyagok esetében azt tapasztalták, hogy azok az AGP genetikai variánsai közül némelyeket preferálnak, azaz elsősorban az AGP A variánsához vagy az AGP F1, AGP S variánsokhoz kötődnek (27-31).

Kumarin-típusú antikoagulánsok (pl. warfarin, acenokumarol) kötődési affinitását vizsgálták az AGP genetikai variánsai esetében. A vizsgált kumarin-típusú antikoagulánsok esetében azt tapasztalták, hogy azok erősebben kötődnek az AGP ORM1 lókuszán kódolt genetikai variánsokhoz, mint az ORM2 variánshoz. Mindezek mellett arra is fényt derítettek, hogy az ORM1 variánsok jobban preferálják az S-enantiomereket a warfarin és acenokumarol esetében, mint az R-enantiomert (27).

Az imatinib, szelektív tirozin-kináz inhibitor, amit krónikus leukémia terápiájában alkalmaznak. Az imatinib farmakokinetikai tulajdonságait és aktivitását jelentősen befolyásolja a gyógyszermolekulát megkötő AGP. Az AGP genetikai variánsai azonban eltérő affinitással kötődnek az imatinibhoz. Az AGP F1 és S variánsai esetében erősebb kötődési affinitást tapasztaltak, mint az AGP A variánsánál (29).

I. 2. 2. Az AGP glikozilációja

A glikoproteinek peptidláncához az oligoszacharidok oxigént és nitrogént tartalmazó kötéseken keresztül kapcsolódhatnak. Az oxigénen keresztül kapcsolódó oligoszacharidokat nevezzük O-glikánoknak, a nitrogén atomon keresztül kapcsolódóak az N-glikánok. A humán AGP öt glikozilációs helyéhez N-glikánok kapcsolódnak. Az N-glikoziláció során az oligoszacharidok a peptidlánc aszparaginjához (Asn) kovalens kötéssel kapcsolódnak. Az aszparaginhoz kapcsolódó első monoszacharid az N-glikánok konzervatív struktúráiban az N-acetil-glükózamin (GlcNAc). Az AGP öt N-glikozilációs helye az alábbi aminosav sorszámú aszparaginokon található meg: Asn-15, Asn-38, Asn-58, Asn-75, Asn-85 (32).

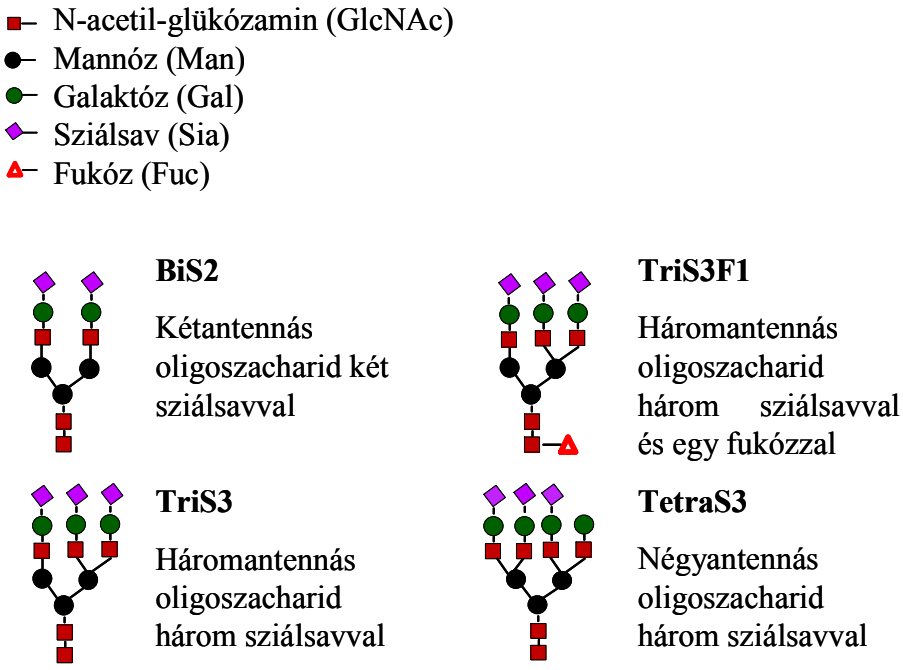
Az irodalom az N-glikánok három csoportját különbözteti meg, a komplex, a magas mannóz tartalmú és a hibrid N-glikán struktúrákat. Mind a három típusú struktúra esetében az oligoszacharidok peptidlánchoz csatlakozó pentaszacharid része (GlcNAc2Man3) megegyezik. Az oligoszacharid struktúrák ezen központi részét, pentaszacharidját leszámítva különböznek egymástól. Az AGP N-glikánjai komplex oligoszacharid struktúrák (3, 32).

Az AGP azok közé a glikoproteinek közé tartozik, amik szerkezetében különböző antennaszámú oligoszacharidok [2-6] találhatók meg. A különböző antennaszámú oligoszacharidok hozzájárulnak az AGP izoformok számának növekedéséhez. A glikozilációs izoformok a monoszacharidok különböző kapcsolódási sorrendjéből is származhatnak. Az AGP N-glikánjai különböző mértékben lehetnek szializáltak és fukoziláltak. Egy adott molekulatömegű és adott monoszacharid sorrenddel rendelkező oligoszacharid esetében is előfordulhatnak izoformok, amit kettő monoszacharid között létrejövő eltérő kötéstípus eredményezhet (32-34).

I. 2. 2. 1. Az AGP oligoszacharidok elnevezése

Az N-glikánok szerkezeti variabilitását csökkenti az oligoszacharid mag konzervatív szerkezete. A komplex N-glikánok közös pentaszacharid egysége

(GlcNAc2Man3) több antennával (2-6) lehet szubsztituálva. Az oligoszacharidlánc terminális monoszacharidja sziálsav lehet. További monoszacharid képes kapcsolódni az oligoszacharidlánchoz fukóz formájában. Az oligoszacharid rövidített elnevezésében az első előtag az oligoszacharidok antennáinak számára utal. Az S és F jelölések a sziálsav és fukóztartalomra vonatkoznak és a jelölést követő szám az adott monoszacharid mennyiségére (2. ábra). A TriS2F1 jelölés a három antennával, kettő sziálsavval és egy fukózzal rendelkező oligoszacharidot jelöli. A bemutatott ábrákon lévő oligoszacharidokon a fukóz az első GlcNAc-hoz kapcsolódik, azonban az nem bizonyított, hogy valóban a jelölt monoszacharidhoz kötődik. Mivel a fukóz több monoszacharidhoz is képes kapcsolódni, csak az oligoszacharidon lévő mennyisége azonosított, de monoszacharidra vonatkozó pozíciója nem. A sziálsav a terminális pozícióban kapcsolódhat, azonban a teljes szializáltság hiányában a sziálsav pozíciója sem azonosított csak a mennyisége (32).



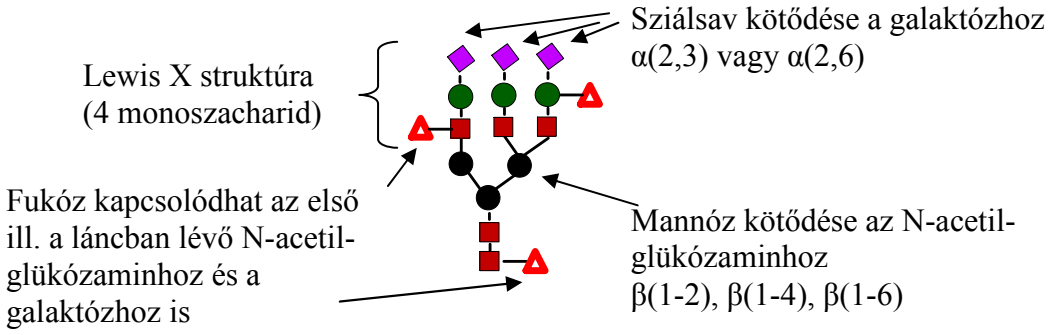
2. ábra: Az oligoszacharidok szerkezetei és rövidített nevei

I. 2. 2. 2. Az AGP glikánok izoformjai

Az AGP glikozilációs szintű eltérései származhatnak az oligoszacharidok különböző antennaszámából, ami alapján megkülönböztetünk két-, három-, négy- és további számú antennás oligoszacharidokat.

További izoformok jönnek létre a monoszacharidok szintjén mérhető különbségek következtében, ami megnyilvánulhat a sziálsav meglétében vagy hiányában, valamint a fukóz kapcsolódásában az oligoszacharidlánchoz vagy annak hiányában (3. ábra).

Egy adott molekulatömegű és adott monoszacharid sorrenddel rendelkező oligoszacharid esetében különböző izoformok jöhetnek létre attól függően, hogy az oligoszacharidot felépítő monoszacharidok milyen kötőhelyen és milyen kötéstípussal kapcsolódnak egymáshoz. A monoszacharidok közötti kötés axiális helyzetű glikozidos kötés esetén α(x-y), ekvatoriális helyzetű glikozidos kötés esetén β(x-y), ahol az x és y a sztereocentrumtól számított kötésben lévő szénatomok számait jelöli (2, 35).



3. ábra: Az AGP-n lévő oligoszacharidok lehetséges szerkezetei, izomerei
(■: N-acetil-glükózamin (GlcNAc), ●: mannóz (Man), ●: galaktóz (Gal),
◆: sziálsav (Sia), ▲: fukóz (Fuc))

A fukóz képes kapcsolódni az oligoszacharidláncban elhelyezkedő GlcNAc-hoz α(1-3) kötéssel, az oligoszacharid magban elhelyezkedő első GlcNAc-hoz α(1-6) kötéssel, és az oligoszacharidláncban elhelyezkedő galaktózhoz α(1-2) kötéssel. Az oligoszacharidláncon a GlcNAc-hoz kötődő fukóz szialil Lewis-X struktúrát hoz létre,

ami négy monoszacharidból felépülő struktúra az oligoszacharidlánc végén. A szialil Lewis-X struktúra monoszacharidjai és kötései: Siaα2 → 3Galβ1 → 4[Fuc1α→3]GlcNAc (1, 32).

Amennyiben sziálsav kapcsolódik az oligoszacharidhoz N-glikánok esetében, akkor a sziálsav a terminális pozícióban foglal helyet a galaktózhoz kapcsolódva α(2-3) kötéssel vagy α(2-6) kötéssel. A kétféle kötésmód eltérő szerkezeteket eredményez, ami különböző receptor affinitásbeli tulajdonságot okozhat, azaz eltérő biológiai hatásban is megnyilvánulhat.

Az oligoszacharidlánc elágazása a Man és GlcNAc monoszacahridok között következik be. A két monoszacharid közötti kötés létrejöhet β(1-2), β(1-4), β(1-6) kötésekkel, ami szintén szerkezetbeli eltérésre adhat okot (1, 32, 35).

Az N-glikán struktúrák nagy variabilitása több különböző AGP izoform megjelenését teszi lehetővé (1, 32).

I. 2. 2. 3. Az AGP izoformok patológiás állapotokban

Patológiás állapotban az AGP glikánjainak antennaszámában és a monoszacharidok szintjén is változások következhetnek be. Számos kóros elváltozás esetében vizsgálták és leírták az AGP glikozilációjában bekövetkező elváltozásokat. A glikozilációs elváltozások jellegzetességei sok esetben nemcsak a betegségtől, hanem a progresszió mértékétől is függnek (36-38).

Akut gyulladások alatt az AGP esetében a glikánok elágazásainak számában tapasztaltak csökkenést, és a kétantennás oligoszacharidok előfordulásának növekedését figyelték meg. A fukoziláció mértékének növekedését írták le és a Lewis-X formák mennyiségének növekedését (37).

Krónikus gyulladások alatt bekövetkező változások jellemzésére autoimmun betegségben szenvedőket vizsgáltak. A reumatoid artritisz esetében bekövetkező glikozilációs elváltozások kettős képet mutatnak. A betegség kezdeti szakaszában a kétantennás oligoszacharidok túlsúlyát figyelték meg, míg a betegség progrediálásával a három- ill. négyantennás oligoszacharidok túlsúlyát írták le. Továbbá hiperfukozilációt és a triszializált N-glikánok expressziójának növekedését tapasztalták (39).

Hashimoto és mtsai különböző daganatos betegségben (nyelőcső-, gyomor-, tüdőrák) szenvedő páciensek esetében vizsgálta az AGP glikozilációját. A vizsgált betegek a daganatos betegség különböző stádiumában voltak. Az AGP glikánjainak fukozilációs szintjét és az elágazások mértékét meghatározónak és jelzőértékűnek találták a rákbetegség progressziójának jellemzésében. A metasztázisok előfordulásának valószínűségét növeli megfigyeléseik alapján a magas fukozilációs index és az oligoszacharidokon lévő jelentős mértékű elágazás. Kutatásaikkal rámutattak arra, hogy nemcsak az AGP plazmaszintjének változása lehet jelzőértékű patológiás állapotban, hanem az AGP izoformjai bizonyos betegségek progresszióját is jelezhetik (40).

Az oligoszacharidok különböző kötéstípussal rendelkező izoformjai a szerkezeti eltérésből adódóan különböző receptor-kötődési affinitással és eltérő biológiai hatással rendelkezhetnek (1). A gyulladásos folyamatok során az endothel sejtek felszínén E-szelektinek expresszálódnak kemokinek és citokinek hatására. Az E-szelektinek a granulociták szialil Lewis-X struktúráival lépnek interakcióba és ezzel a granulociták gyulladt érterületen történő akkumulációját idézik elő. Az irodalmi feltételezések szerint a gyulladás hatására szintetizálódott AGP szialil Lewis-X struktúrában gazdag. Lewis-X-gazdag AGP termelődhet a máj, az endothel sejtek vagy granulociták indukciója hatására is. A Lewis-X struktúrát expresszáló AGP molekulák is képesek interakcióba lépni az E-szelektinekkel, így kompetitív reakcióba lépni és gátolni a gyulladt érterületen akkumulálódó granulocitákat. Az AGP így a granulociták akkumulációjának gátlásával fejtheti ki gyulladáscsökkentő hatását (1, 12).

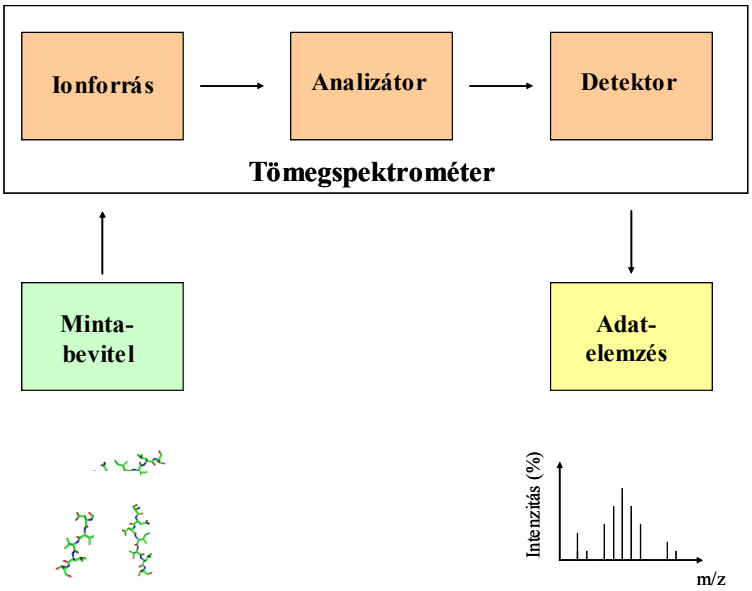
Irodalmi adatok alapján az AGP befolyásolni tudja az apoptózis folyamatát. Rágcsálókon végrehajtott kísérletek is arra engednek következtetni, hogy az AGP anti-apoptotikus hatással bír (41). Tumor nekrózis faktor indukálta apoptózis esetében hepatociákon szintén az AGP anti-apoptotikus hatását figyelték meg (42). *In vivo* kísérletekben, Burkitt limfómás sejtek esetében az anti-IgM antitest-indukált apoptotikus folyamat AGP általi szuppresszióját írták le. Az AGP anti-apoptotikus hatását az α(2-6) kötődésű sziálsavnak tulajdonították, mivel az α(2-6) neuraminidáz enzimmel történő inkubációt követően megszűnt az apoptózist gátló hatás (43). Az α(2-3) kötődésű sziálsavval történő inkubációt követően nem tapasztaltak anti-apoptotikus hatást. Az irodalomban leírtak alapján az AGP apoptotikus hatását a sziálsav galaktózhoz történő kötésmódja befolyásolja (43).

I. 3. Tömegspektrometria a proteomikában és glikoproteomikában

I. 3. 1. Tömegspektrometria

A tömegspektrometria a molekulatömeg meghatározásán alapszik. A tömegspektrométerrel végzett mérések (MS-mérések) eredményeként a spektrumokon a mintamolekulák intenzitását kapjuk meg tömegük és töltésük függvényében. A tömegspektrometria nemcsak pontos molekulatömeg-meghatározást tesz lehetővé, hanem információt nyújthat a vizsgált molekula szerkezetéről is. Tandem MS mérések segítségével kiválaszott molekulák fragmentációja vizsgálható, ami a biomolekulák esetében is széles alkalmazási kört tesz lehetővé. A proteomikában lehetővé válik a peptidszekvenálás, a glikoproteomikában az oligoszacharidok szekvenálása. Kapcsolt technika, folyadékkromatográfia alkalmazása tömegspektrométeres detektálással proteinminták esetében a peptidek elválasztását teszi lehetővé, az oligoszacharidok esetében az izomerek pontosabb analízisét segíti (44-47).

A tömegspektrometria, mint analitikai módszer egyre nagyobb teret hódít előnyeinek köszönhetően komplex biológiai minták analízisében, a proteomika és a glikoproteomika területén (4. ábra). A tömegspektrometriás analízis előnye, hogy kis anyagmennyiségek és komplex biológiai mátrixok komponenseinek szerkezet-meghatározására alkalmas. Az MS analízisek mellett szól a rövid analízis idő, az extrém érzékenység (10^{-15} mólnyi anyagmennyiség kimutatása) és a kromatográfiával történő kapcsolási lehetőség. Hátrányként említhető meg, hogy a kapott spektrumok értékelése bonyolult lehet és az izomerek megkülönböztetése akadályokba ütközhet kapcsolt technikák vagy egyes mintaelőkészítési lépések alkalmazása nélkül.



4. ábra: A tömegspektrometriás analízis sematikus ábrája (Az ábra saját szerkesztésű a http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm internetes oldal felhasználásával)

A proteomikai kutatások fókuszában a mátrix segített lézer ionizációs (Maldi) és elektrospray ionforrással (ESI) rendelkező tömegspektrométerek állnak. 1988-ban Tanaka és tőle függetlenül tevékenykedő Hillenkamp és mtsai nagy molekulatömegű biomolekulák ionizációra alkalmas mátrix segített lézer deszorpció/ionizáció (Maldi) elnevezésű ionforrást fejlesztettek ki. A Maldi ionforrás segítségével és repülési idő (Tof) analizátorral proteinek és egyéb biomolekulák molekulatömegének gyors analízisére nyílt lehetőség. Fenn és mtsai a párologtatáson és porlasztáson alapuló ESI ionforrás kifejlesztésével szintén lehetővé tették proteinek ionizációját.

Kutatásaim során a biomarkerek és glikoproteinek analízisét elektrospray ionforrással rendelkező Q-Tof Premier tömegspektrométerrel végeztem. Dolgozatom további részében a kutatásaim során alkalmazott tömegspektrometriás technikát mutatom be.

A Q-Tof készülék esetében a minta bejuttatásának módja történhet direkt injektálással vagy folyadékkromatográfiás rendszer segítségével, on-line HPLC-ESI-MS kapcsolással. A bejutott biomolekulák az ionforrásban ionizálódnak. A Q-Tof készülékek előnye, hogy több ionforrással is kompatibilisek, alkalmazhatók ESI vagy

Maldi ionforrással is. Kutatómunkám során a vizsgált biomolekulák analízisére ESI ionforrást alkalmaztam, a HPLC-vel történő on-line kapcsolási lehetőség miatt.

A porlasztáson alapuló elektrospray (ESI) ionforrás a proteomikai kutatásokban alkalmazott egyik leggyakoribb ionizációs technika. A folyékony halmazállapotú mintaoldat az eluensekkel keverve kapillárison keresztül jut az ionforrásba, ahol nagy feszültség alkalmazása, porlasztó gáz és fűtés segíti az ionizációt. Az ionforrásban többszörösen töltött ionok keletkeznek, amik továbbjutva az analizátorba és detektorba bonyolult spektrumokat eredményezhetnek. Az ESI érzékenysége 10^{-12}-10^{-15} mól, kis- és nagytömegű molekulák meghatározására egyaránt alkalmas. Az ESI a mátrix segített lézer ionizációs/deszorpciós ionforráshoz (Maldi) képest kevésbé tolerálja a sókat és egyéb szennyezőket, csak illékony pufferrel alkalmazható. Előnye, hogy kapcsolható on-line kromatográfiával és mennyiségi meghatározásra is alkalmas. Használható keverékek analízisére is, azonban a többszörös töltésű ionok és a bonyolult spektrumok miatt érdemes a keverékeket MS-analízis előtt kromatográfiával elválasztani. Az ESI-vel történő mérések reprodukálhatósága kedvezőbb, mint a Maldi-val történő analíziseké, a kimaradó kristályosodási folyamatok miatt (48-50).

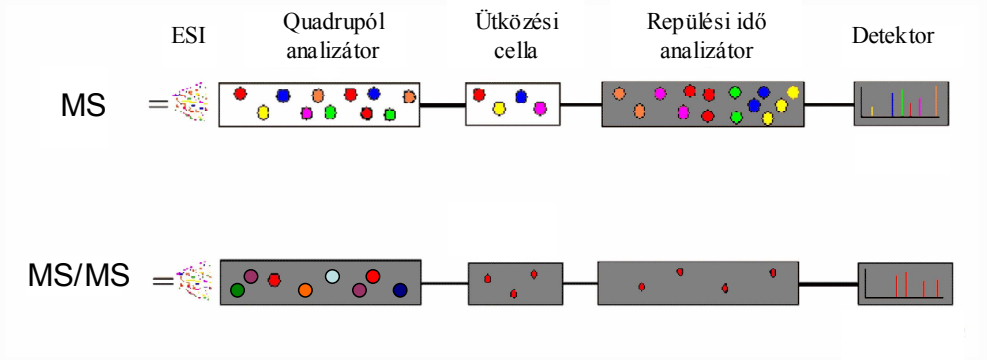
Az ionizáció módját a mintamolekulák funkciós csoportjának protonaffinitása is befolyásolja. A nagy protonaffinitással rendelkező mintamolekulák pozitív ionizációs módban protonálódnak. A pozitív ionizáció általában az aminokra és a peptidekre jellemző, $R\text{-}NH_2 + H^+ = R\text{-}NH_3^+$. A karboxil- vagy hidroxil-csoporttal rendelkező molekulák egy proton elvesztésével negatív ionizációval ionizálódnak. $R\text{-}COOH = R\text{-}COO^-$, $R\text{-}OH = R\text{-}O^-$. Negatív ionizáció az oligoszacharidokra és az oligonukleotidokra jellemző.

A tömegspektrométerek analizátorának fő funkciója az, hogy az ionizálódott molekulákat tömeg és töltés alapján elválassza egymástól. A Q-Tof készülék a tandem tömegspektrométerek azon csoportjába tartozik, amelyek kettő, egymástól különböző analizátort tartalmaznak. A Q-Tof Premier tömegspektrométer egy quadrupól és egy Tof analizátorból áll, amik lehetővé teszik proteomikai minták mintamolekuláinak és fragmenseinek analízisét. A kettő analizátor között található meg az ütközési cella.

MS-módban az ionforrásban ionizálódott molekulák először a quarupól analizátort érik el, ami az ionnyalábot az ütközési cellán keresztül a második

analizátorba, a Tof-ba fókuszálja. A Tof választja el egymástól tömeg és töltés alapján az ionizálódott molekulákat.

MS-MS módban az ionizálódott molekulák közül bármelyik kiválasztható és fragmentációja analizálható. Az első, a quadrupól analizátor kizárólag a kiválasztott molekulát juttatja tovább az ütközési cellába, ahol inert gáz (argon) végzi az ionizálódott mintamolekulák ütköztetését és eredményezi a fragmentációjukat. A fragmentált ionokat szintén a második analizátor, a Tof választja el tömeg és töltés alapján. A fragmentációhoz szükséges optimális ütközési energia biomolekuláktól függően különbözik (5. ábra).



5. ábra: MS és MS/MS mérések Q-Tof analizátorral (Az ábra saját szerkesztésű a http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm internetes oldal felhasználásával)

A tömegspektrometriás mérések többszörösen töltött ionokat tartalmazó spektrumait számítógépes adatbázisok segítik értékelni. Proteomikai kutatások során a peptidek és peptid fragmensek elméleti tömegét hasonlítják össze az adatbázisok a mért adatokkal. A proteomikai szoftverek nagymértékben hozzájárulnak a spektrumok felvételével nyert hatalmas adattömeg értékeléséhez (51-53).

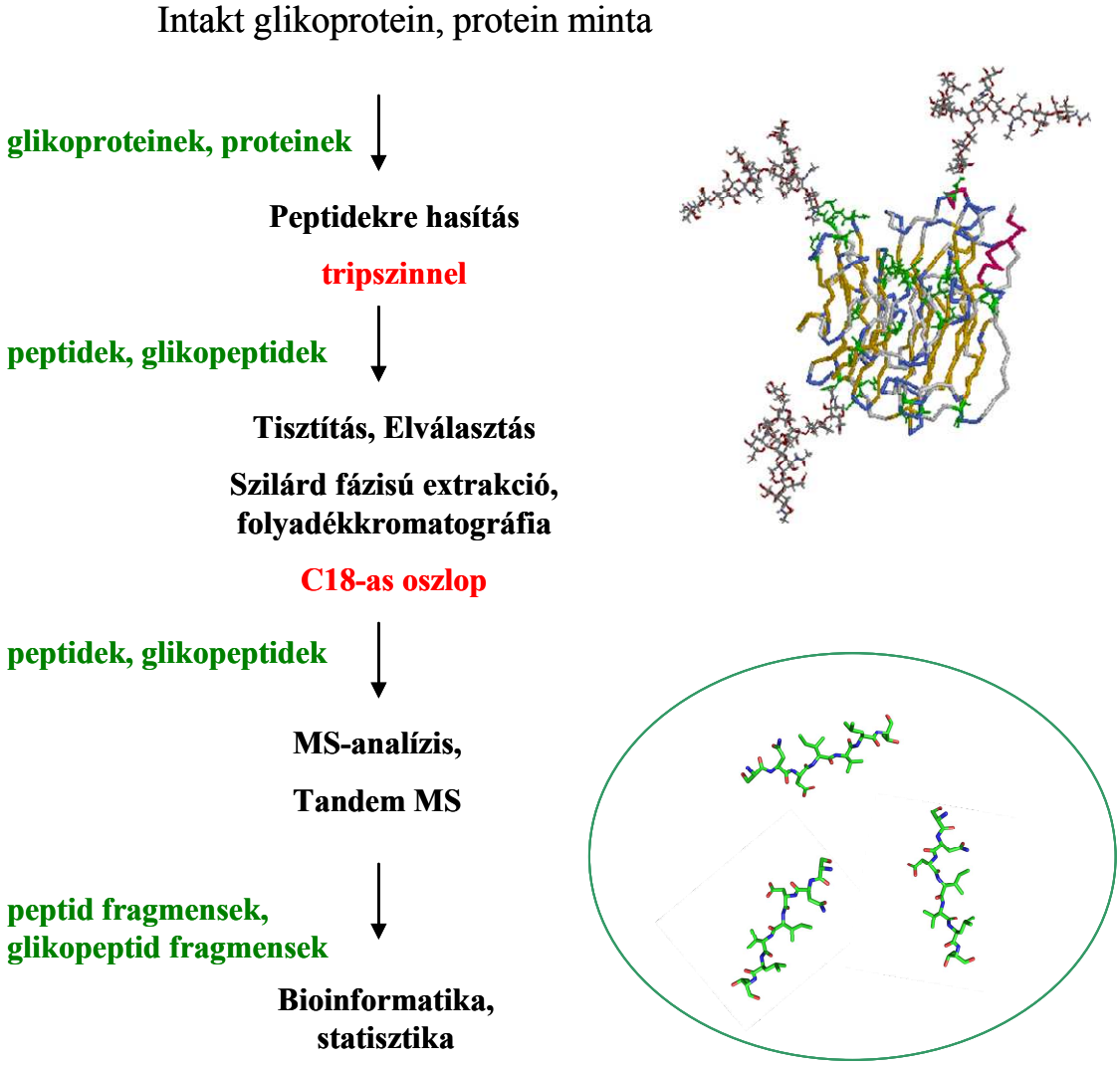
I. 3. 2. Proteomikában alkalmazott tömegspektrometriás módszerek

Biológiai minták részletes és pontos analízisét a minták komplexitása, és több komponens egyszerre történő jelenléte nehezíti meg. Ahhoz, hogy a vizsgálni kívánt

proteinről részletes mennyiségi és minőségi információhoz is jussunk, érzékeny és szelektív technikák együttes alkalmazására van szükség.

A proteomikai kutatások egyik, és a tömegspektrometriában leggyakrabban alkalmazott módszere a „buttom-up" technika. A buttom-up technika az alulról fölfelé történő építkezésre utalva azt jelenti, hogy az ismeretlen protein azonosítása a peptidek meghatározásával történik. A vizsgálni kívánt protein peptidekre bontása szükséges az analízist megelőzően. A peptidekre hasítás általában enzimatikus módszerrel, tripszinnel történik. Az MS-mérést megelőző mintaelőkészítés kulcsfontosságú szerepet tölt be, hiszen a tömegspektrometriás analízis érzékenységét növeli a tiszta, szennyeződés nélküli minta.

A peptidek MS-analízisét megelőzően érdemes azokat folyadékkromatográfiás módszerrel elválasztani egymástól, megelőzve a többszörösen töltött ionokat tartalmazó, bonyolult spektrumok értékelését. A folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás mérések (HPLC-MS) peptidek elválasztását és tömeg szerinti analízisét teszik lehetővé. A tripszinnel emésztett protein peptidjeinek keverékét fordított fázisú oszlop alkalmazásával lehet elválasztani egymástól és az oszlop ESI ionforráshoz közvetlenül kapcsolható. Tandem MS mérésekkel kiegészítve a detektálást a peptidekről és a vizsgálni kívánt molekulákról részletes szerkezeti információkat is kaphatunk. A „buttom-up" módszerrel végzett kutatások eredményeinek értékelését bioinformatikai szoftverek és adatbázisok segítik. Egy MS-mérés során a spektrumban kapott peptid-tömegeket összevetik genomikai vagy tömegspektrometriai adatbázisok értékeivel. A protein azonosítása a peptidek tömegének meghatározásával és azok proteinhez rendelésével történik. A módszer sikeres alkalmazásához és az adott protein azonosításához több peptid meghatározására van szükség. Több peptid azonosításával a protein aminosav-szekvenciájának lefedettsége növekszik és az értékelés és meghatározás válik pontosabbá (44, 54, 55).



6. ábra: A proteomikai kutatások folyamatábrája egy glikoprotein és peptidek bemutatásával (Az ábra saját szerkesztésű, a http://www.glycosciences.de/modeling/glyprot/php/main.php és a http://www.emblheidelberg.de/~seqanal/courses/proteinEvolutionEllsTorinoJan09/introToProteinStructureAndFunction.html internetes oldalak felhasználásával.)

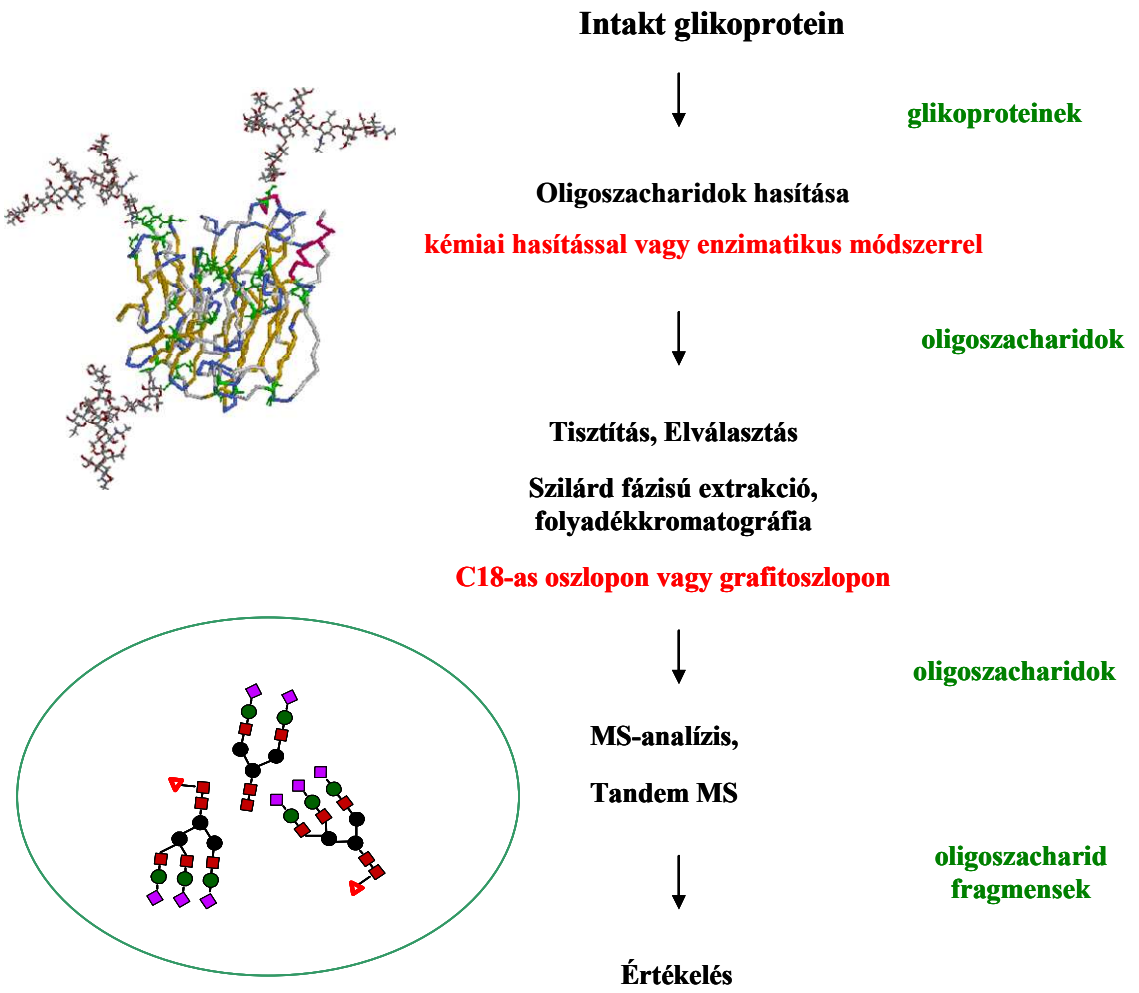
A proteomikai kutatások folyamatábráját mutatja a 6. ábra, amelyen nyomon követhetők az egymás utáni lépések a mintaelőkészítési folyamattól kezdve. Az ábrán a számos proteomikai technika közül a kutatásaim során alkalmazott buttom-up módszert mutatom be. A tripszines emésztés során alkalmazott detergensek a tisztítási és elválasztási lépések során távolíthatók el a mintából. A minták tisztítására a szilárd fázisú extrakciós technika (SPE) oszlopai, ill. HPLC oszlopok alkalmazhatók. A

peptidek és glikopeptidek elválasztására fordított fázisú, C18-as oszlopok alkalmazhatók tömegspektrométerrel kapcsolva (56-58).

I. 3. 3. Glikomikai kutatások tömegspektrometriával

A glikomiai kutatások előterében a glikoproteinekről lehasított oligoszacharidok állnak. Az oligoszacharidok mintaelőkészítési folyamata sok hasonlóságot mutat a peptidek előkészítésével (7. ábra). Az oligoszacharidok hasítása a glikoproteinről történhet kémiai hasítással vagy enzimatikus módszerrel. A tiszítási lépéshez választható oszlopok is különbözőek lehetnek. Alkalmazhatók fordított fázisú vagy grafittöltetű oszlopok. További mintaelőkészítési lépés lehet az oligoszacharidok derivatizációja az MS-analízist megelőzően (59, 60).

Az oligoszacharidok analízisében az érzékenységének és szelektivitásának köszönhetően jelentős szerepet kap a HPLC-MS módszer. A folyadékkromatográfia az oligoszacharidok elválasztását végzi. A tömegspektrometriás detektálás az oligoszacharidok tömeg szerinti azonosítását teszi lehetővé. Az oligoszacharidok izomereinek megkülönböztetését a pusztán tömegspektrometriás, tömeg szerinti elválasztás nem teszi lehetővé. A HPLC-MS segítségével, folyadékkromatográfia beiktatásával - az egyes izomerek elválasztásával - részletesebb szerkezeti információkat kaphatunk a vizsgált oligoszacharidokról (61-63).



7. ábra: Az oligoszacharidok tömegspektrometriai mérésének folyamatábrája, egy glikoprotein és oligoszacharidok bemutatásával. Az ábra a számos mintaelőkészítési folyamat és analízis közül csak a kutatásaimban alkalmazott módszereket tartalmazza. (Az ábra saját szerkesztésű, a http://www.glycosciences.de/modeling/glyprot/php/main.php internetes oldal felhasználásával.)

Az oligoszacharidok glikoproteinről történő lehasítása történhet kémiai hasítással, azaz hidrazinolízissel vagy enzimek segítségével (64).

Hidrazinolízis során O- és N-glikánok is lehasíthatók a peptidláncról. A hasítás hőmérsékletfüggést mutat; az O-glikánok 60 ºC körül hasadnak le a peptidláncról, míg az N-glikánok felszabadításához 95 ºC szükséges. Az O-glikánok hasítása azonban csak részleges azokban az esetekben, ha az O-glikánok a proteinlánc egy kisebb részén

csoportosulnak. A hidrazinolízis módszere több hátránnyal is járhat. Mivel a peptidek közötti kötést roncsolja, a peptidekre vonatkozó információ egy része eltűnik az extrém hasítási körülmények következtében. A magas hőmérsékleten végbemenő reakció a glikánok struktúráját is roncsolhatja, egyes monoszacharidok elvesztését eredményezheti. A glikánok hasítását a strukturális modifikációk elkerülése miatt érdemes enyhébb kísérleti körülmények mellett végezni (61, 64).

Az oligoszacharidok hasítása történhet enzimatikus módszerrel is. A peptid-N4-(acetil-ß-glükózaminil)-aszparagin amidáz N-glikozidáz F enzim rövidtett neve: PNGáz F enzim. Az említett enzim az aszparaginhoz kötődő oligoszacharidok lehasítását végzi a peptidláncról. Natív formában távolítja el az oligoszacharidot NH_2-csoport végződéssel, az aszparagint aszparaginsavvá alakítva. A glikoproteinek enzimmel történő inkubációja 37 ºC-on ajánlott, a PNGáz F enzim hatékony működése céljából, ami nem eredményez extrém szerkezetváltozást a glikoprotein és az oligoszacharidok szerkezetében. Az enzim működéséhez optimális pH-tartomány 7,0-9,5 között található (64-66).

Packer és mtsai glikoproteinekről lehasított oligoszacharidok tisztítási lehetőségeit mutatják be grafittöltetű szilárd fázisú extrakciós (SPE) oszlopokon. A grafittöltetű SPE oszlopok acetonitrillel és vízzel történő kondícióját és tisztítását javasolják. A minta elúciójához választott eluens függ a szénhidrátok molekulatömegétől, valamint semleges vagy savas csoportok jelenlététől a monoszacharidokon. Monoszacharidok elúcióját vízzel javasolják. Semleges oligoszacharidok elúciójához 25 % ACN-t tartalmazó vizet, míg sziálsavat tartalmazó oligoszacharidok elúciójához a 25 % ACN-t tartalmazó vizes eluens savval történő elegyítését javasolják (67).

I. 3. 4. Folyadékkromatográfia alkalmazása az oligoszacharidok HPLC-MS vizsgálatában

A fordított fázisú folyadékkromatográfiás rendszerek esetében csak kismértékű interakció tapasztalható a poláris, derivatizálatlan oligoszacharidok és a hidrofób állófázis között. Fordított fázisú oszlopok esetében a leggyakrabban alkalmazott eluens

a víz. A natív, poláris oligoszacharidok minimális retenciós idővel eluálódnak a C-18–as oszlopokon (68).

Az antennaszámukban különböző oligoszacharidok (két-, három-, négyantennás glikánok) elválása sem figyelhető meg fordított fázisú oszlopokon. A retenció mértéke annyira kicsi, hogy a holtidő után pár perccel, - a kromatográfiás futás 3-5 perce között - eluálódnak az oligoszacharidok. Ahhoz, hogy elfogadható mértékű elválás kialakuljon az oligoszacharidok esetében, egy hidrofób ágenssel történő derivatizálásra van szükség. A derivatizálással azonban nemcsak a glikánok retenciós tulajdonságai változnak meg, hanem a tömegspektrometriás érzékenység is megváltozhat, továbbá az ionizációs és fragmentációs tulajdonságok is eltérőek lehetnek. A derivatizálás újabb mintaelőkészítési lépést igényel a tömegspektrometriás mérés előtt, ami szennyezőket juttathat be a biológiai rendszerbe, valamint az újabb tisztítási lépés anyagveszteséget eredményezhet (69).

Az immunglobulin G antitest N-glikánjait detektálták tömegspektrométerrel fordított fázisú oszlopon történő elválasztást követően Xiaoyu és mtsai. Az N-glikánok derivatizálása 2-aminobenzamiddal történt a retenciós idejük késleltetése miatt. Xiaoyu által kidolgozott HPLC-MS módszer alkalmas az N-glikánok magas mannóz tartalmú, hibrid és komplex típusú glikánjainak elválasztására. Az elválasztás 160 perces kromatográfiás futás alatt történik (70).

A grafitoszlopok töltetét 100% porózus grafit alkotja. A hexagonálisan elhelyezkedő szénatomok lapos felületeket képeznek, amelyekhez planáris molekulák képesek szorosan illeszkedni. A nem planáris molekulák és a grafittöltet között kevesebb kölcsönhatás alakul ki, ami kisebb retenciót eredményez, mint planáris molekulák esetében. A grafittölteten nincsenek kémiailag kötött oldalláncok. Az oszlopok az erősen poláris vegyületek elválasztását teszik lehetővé, mivel felületük sztereo-szelektív, lehetséges izomerek és hasonló szerkezetű vegyületek elválasztása is. A grafittöltetű oszlop széles pH-tartományban képes hatékonyan működni; 1-14 pH közötti tartományban használható. Az oszlopok eluensei (0,1% hangyasavas vagy ecetsavas eluens, illetve puffert tartalmazó ammónium-acetátos vagy ammónium-formiátos eluens) tömegspektrométerrel is jól alkalmazhatók (71-74).

Oligoszacharidok elválasztására az 1990-es évek elején kezdték el alkalmazni a grafittöltetű oszlopokat. Az első eluensek az oligoszacharidok elválasztására az acetonitril és trifluorecetsavat tartalmazó víz voltak (75-78).

Wilson és mtsai SDS-poliakril-gélelektroforézis alkalmazásával elválasztott O-, és N-glikozidokat vizsgáltak. Az analízishez grafitoszlopot választottak és elektrospray ionforrás alkalmazásával negatív ionizációs technikával detektálták az ionokat. Eluensként acetonitrilt és 10 mM-os ammónium-hidrogénkarbonátot alkalmaztak (79).

Wuhrer és mtsai a grafitoszlopot mind a natív, mind a derivatizált glikánok analízisére és elválasztására kiválóan alkalmazható oszlopnak találták. Kiemelik a grafitoszlop előnyét abban, hogy széles pH-tartományban és MS-barát eluensekkel alkalmazható az oligoszacharidok elválasztására (69).

Satsuki és mtsai egy grafitoszloppal kapcsolt tömegspektrometriás módszert dolgoztak ki glikoproteinek N-glikánjainak analízisére. A folyadékkromatográfiás rendszer eluenseiként a következőket alkalmazták: A eluens, 5 mM ammónium-acetát pH: 9,6, ami 2 % acetonitrilt tartalmazott; B eluens, 5 mM ammónium-acetát pH: 9,6, ami 80 % acetonitrilt tartalmazott. A gradiens 5 % B eluensről 40 % B eluens-tartalomig nőtt 80 perc alatt, 50 µl/perc áramlási sebességgel. Satsuki és mtsai több glikoprotein N-glikánjait analizálták, vizsgálták a ribonukléáz B, a rekombináns humán eritropoetin és a humán melanoma sejtekből származó plazminogén aktivátor oligoszacharidjait (80).

Karlsson és mtsai O-glikánokat analizáltak grafitoszlopos elválasztással ESI-MS módszerrel. Hexózokból és N-acetilhexózokból felépülő oligoszacharid izomereit sikerült elválasztaniuk egymástól grafitoszlop segítségével. Az oligoszacharidok folyadékkromatográfiás analíziséhez ammóniát tartalmazó eluenseket alkalmaztak, a detektálás negatív ionizációs módban történt (81).

A grafitoszlop kiváló állófázisnak bizonyult erősen poláros molekulák, natív oligoszacharidok elválasztására is. Robinson és mtsai natív oligoszacharidokat vizsgáltak (68). A natív oligoszacharidok erősen poláris, többszörösen elágazó struktúrák, amik többféle izomerformában vannak jelen, fordított fázisú folyadékkromatográfiás oszlopon alig vagy egyáltalán nem mutatnak retenciót. A natív oligoszacharidok retenciós idejének növelését C18-as oszlopon derivatizálással lehet elérni, ami azonban idő- és anyagigényes és hozzájárul a mintaelőkészítés alatti

elkerülhetetlen anyagveszteséghez. A natív oligoszacharidokra kis protonaffinitás jellemző, ami így különösen alacsony intenzitású tömegspektrometriás jelet idéz elő, detektálásuk negatív ionizációs technika alkalmazásával kedvezőbb.

Robinson és mtsai az oligoszacharidokat grafitoszlop segítségével választották el és elektrospray ionforrás alkalmazásával tömegspektométerrel detektálták. Az oligoszacharidok detektálásához nem használtak semmilyen derivatizálószert. A többszörösen elágazó 20 monoszacharid-egységig terjedő oligoszacharidokat (Hex-20) Triticum Aestivum fajból extraháltak. A kromatográfiás elúcióhoz háromféle eluenst használtak: A-eluensként vizet, B eluensként acetonitrilt és C eluensként 2-izopropanolt. Kutatásuk során azt tapasztalták, hogy az acetonitril sokkal nagyobb elúciós erővel rendelkezik oligoszacharidokra nézve, mint a metanol. Azonban acetonitril alkalmazása mellett is gradiens elúciót kellett alkalmazniuk ahhoz, hogy a nagyobb tömegű oligoszacharidok is elfogadható időn belül eluálódjanak. Az elúció során az acetonitril arányát növelni kellett 30 %-ig. Azonban az acetonitril arányának növelésével és gradiens alkalmazásával sem volt kielégítő a nagy tömegű oligoszacharidok elúciója, az oszlopról történő lemosásuk nem volt teljes. 2-izopropanol és acetonitril 1:1 arányú keveréke járult hozzá a nagy tömegű oligoszacharidok (Hex-20) elúciójához. A Hex-20 elúciója 15 percen belül bekövetkezett. A 2-izopropanol elúciós ereje az oligoszacharidokra nézve az acetonitrilnél is nagyobb. A 2-izopropanol:acetonitril 1:1 arányú keveréke alkalmas eluensnek bizonyult a nagyobb tömegű és a grafitoszlophoz erősebben kötődő oligoszacharidok elúciójára (68).

Kutatások során azt tapasztalták, hogy a grafitoszlopról történő elúciót az oligoszacharidok mérete befolyásolja. A nagyobb méretű oligoszacharidok elúciója általában később következik be, retenciós idejük nagyobb, mint a kisebb oligoszacharidoké. Az oligoszacharidok elágazásai is befolyásolják a retenciót. Általában az elágazás csökkenti a retenciót, mivel valószínűleg az oligoszacharidok hidrofób jellegét csökkenti. Az oligoszacharidok grafitoszlopon produkált elúciós sorrendje némi hasonlóságot mutat a fordított fázison elváló 2-aminobenzamiddal jelölt glikánok elúciójával (68).

Robinson és mtsai nem találtak egyértelmű összefüggést az oligoszacharidok mérete és az elúció sorrendje között. Azt tapasztalták, hogy bizonyos esetekben a kisebb tömegű oligoszacharidok nagyobb tömegű oligoszacharidokkal együtt eluálódnak. Ezt a

jelenséget a grafitoszlop felülete és a mintaoldat között bekövetkező interakcióval magyarázták. A planáris molekulák erőteljesebben képesek kötődni a grafitoszlop felületéhez, mint a kevésbé planárisak. A grafitoszlop felülete is planáris és a felületen gyenge kölcsönhatások jöhetnek létre a planáris oligoszacharidokkal. A különböző tömegű oligoszacharidok egy időben történő elúciója azért lehetséges, mert az oligoszacharidok mintájában az izomerek különböző formában vannak jelen és különböző mértékben planárisak. Ez az elmélet is megerősíti azt a megfigyelést, hogy az elágazással rendelkező oligoszacharidok kisebb retenciós idővel rendelkeznek, azaz hamarabb eluálódnak, mert kevésbé planáris szerkezetükből kifolyólag kevésbé kötődnek a grafitoszlop planáris felületéhez (68).

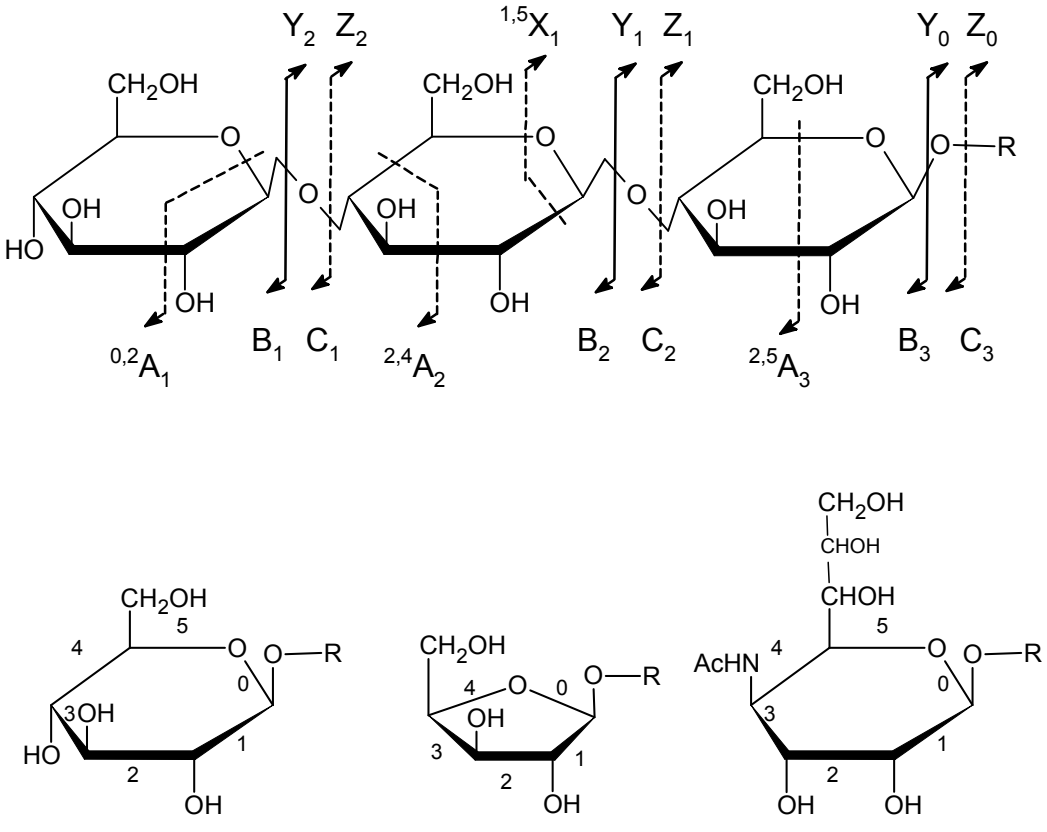
Ahhoz, hogy az oligoszacharidok és a grafitoszlop közötti kölcsönhatásokat jobban megértsük, további kutatásokra van szükség. Az irodalomban meglévő információk is kiegészítésre szorulnak az oligoszacharidok és a grafitoszlop között végbemenő interakciók tekintetében (77). Ugyanakkor a szakirodalomban leírtak alapján elmondható, hogy a grafitoszloppal kapcsolt tömegspektrometriás analízis a glikoproteinekről lehasított oligoszacharidok analíziséhez kiváló lehetőséget kínál. A grafitoszlopon elváló oligoszacharidok izomereinek analízise is megvalósítható, az időigényes és anyagveszteséget okozó derivatizálás elkerülésével (72, 73, 77).

I. 3. 5. Oligoszacharidok tandem MS fragmentációja

Az oligoszacharidok fragmensei tömegspektrometriás detektálással az ütközési energia növelésével vizsgálhatók. A fragmensek származhatnak a glikozidos kötés, illetve a monoszacharidok gyűrűjének felhasadásából. A glikozidos kötés kettéhasadása eredményezi a monoszacharidot, illetve a monoszacharid egységekből felépülő fragmenseket. Több monoszacharid egység lehasadása egy teljes antenna elvesztését is eredményezheti (64, 82)

Az oligoszacharidok fragmentációjának alkalmazott nomenklatúrájáról Domon és Costello ír (83). Az A_i, B_i és C_i jelölések a nem redukáló szénhidrátok megjelölésére alkalmasak. Az X_j, Y_j és Z_j jelölések a redukáló szénhidrátok jelei (8. ábra). A

glikozidos kötés felhasadása és az abból származó fragmensek azonosítása az oligoszacharidok szekvenciájára vonatkozó információval szolgálhat. A monoszacharid gyűrűjének a felhasadása a monoszacharidok közötti kötés típusáról adhat információt. Az A_i, B_i és C_i jelölések esetében az $_i$ a felhasított glikozidos kötések számát jelenti a nem redukáló részről számítva. Az X_j, Y_j és Z_j esetében a $_j$ az interglikozidos kötések számát jelöli az aglikontól számítva, vagy a nem redukáló végtől. Az aglikon glikozidos kötésének a száma 0. A monoszacharidok gyűrűjének felhasadásából létrejött fragmenseket az A_i és X_j jelölésekkel látják el. Mivel többféle fragmentáció lehetséges a monoszacharidok gyűrűjét illetően, ezért újabb jelölést kell alkalmazni az A_i és X_j jelek mellett. A $^{k,l}A_i$ és $^{k,l}X_j$ jelölésekben a ^{k} és ^{l} feliratok a monoszacharidok azon kötéseinek a számát jelölik, amelyek felhasadtak az adott fragmentációban (83).



8. ábra: A fragmensek jelölése Domon és Costello elnevezése szerint (83)

A B_i, C_i és Y_j, Z_j fragmensek nem igényelnek további specifikációt (8. ábra). Az A_i fragmensek esetében azt tapasztalták, hogy ritkán fordulnak elő pozitív ionizációs

technikával felvett spektrumokban. Az X_j ionok gyakran láthatók pozitív ionoizációs technika alkalmazása mellett és ritkábban negatív ionizáció esetében. Az elágazó és több antennával rendelkező oligoszacharidok esetében, ha a fragmentáció helye beazonosítható az antennán, illetve az oligoszacharid magban akkor újabb jelölések szükségesek. Minden antennát egy görög betű (pl. α, β, γ) jelöl. Ha az antennák tömege különbözik, akkor az α jelöli a legnagyobb tömegű antennát, majd β és γ a csökkenő tömegű antennákat. Ha az α antennán következett be a fragmentáció akkor az alábbi jelöléseket alkalmazzák: $A_i\alpha$, $B_i\alpha$, $C_i\alpha$, $X_i\alpha$, $Y_i\alpha$, $Z_i\alpha$.. Az oligoszacharid magban elhelyezkedő monoszacharidok fragmentációját nem jelölik külön görög betűvel. Azonban a glikozidos kötések számát jelölő szám az oligoszacharid magot is magában foglalja. A α' antennához kapcsolódó további elágazás jele α'', ahol α' tömege meghaladja α'' tömegét (83).

Wheeler és Harvey negatív ionizációs technikával analizáltak szializált szénhidrátokat tömegspektrometriás detektálással (84). A detektálást Maldi-Tof és ESI-Tof tömegspektrométerekkel végezték. A szénhidrátokat nem derivatizálták. Szializált, negatív töltéssel rendelkező szénhidrátok érzékenységét MS-detektáláskor negatív ionizációs módban kedvezőbbnek észlelték, mint pozitív módban. A szénhidrátok tandem MS-mérései során az α(2-3) és α(2-6) kötésű sziálsavak fragmentációra kifejtett hatását vizsgálták. Méréseik eredményeként az α(2-6) kötésű sziálsavra jellemző fragmenst írtak le. A 306-os m/z-jű fragmens, az $^{0,4}A_2$ fragmentáció során jön létre CO_2 vesztéssel, ami csak a sziálsavat és galaktózt α(2-6) kötésben tartalmazó szénhidrátokban jelenik meg. A $^{0,4}A_2$ fragmens a láncvégi α(2-6) kötésű sziálsav és a sziálsavat követő monoszacharid, a galaktóz gyűrűjének felhasadásából származik. Wheeler és mtsai triszacharid, pentaszacharid és egy kétantennás oligoszacharid fragmentációját vizsgálták. A vizsgált izomerek vagy csak α(2-3) kötésű vagy csak α(2-6) kötésű sziálsavval rendelkeztek. A kétantennás, két sziálsavval rendelkező oligoszacharid (BiS2) analízisekor a tandem MS spektrumban 2x negatív töltésű ionként detektálták a molekulaiont és kis intenzitással 1x töltésű ionként Na-addukttal. A BiS2 fragmensei 1x ill. 2x töltésű ionként jelentek meg a spektrumban. Az α(2-3) kötésű és a α(2-6) kötésű sziálsavak közötti megkülönböztetést a 306-os m/z-jű ion jelenlétének igazolásával végezték (84).

II. CÉLKITŰZÉSEK

Az AGP nagy szerkezeti variabilitással rendelkező glikoprotein. Izoformjai származhatnak az aminosav-sorrendjének eltérő jellegéből, illetve az oligoszacharidok különböző szerkezetéből. Az aminosav-sorrendben megnyilvánuló eltérések a genetikai variánsokat eredményezik. Az oligoszacharidok szintjén megnyilvánuló szerkezeti heterogenitás az oligoszacharidok különböző monoszacharid összetételére, a monoszacharidok eltérő kapcsolódási sorrendjére, valamint a monoszacharidok kapcsolódási pozícióira és ezek sztereokémiájában mutatkozó különbségekre vezethető vissza. Az izoformok analízise nagy szelektivitással és ezzel egyidőben nagy érzékenységgel rendelkező technikákat igényel. Erre a célra jelenleg nincs jól bevált, széles körben alkalmazott módszer, ezért kutatómunkám egyik fő célja az izoformok analízisére szolgáló módszerek kidolgozása volt. Kutatásaim másik fő célja a kidolgozott módszerek orvosbiológiai alkalmazása volt.

1. A kidolgozott HPLC-MS módszer alkalmazásával célom az AGP genetikai variánsainak vizsgálata volt. Egy glikoprotein vizsgálatával, olyan biomarkereket meghatározó módszert alkalmaztam, ami nem az egyes proteinek megléte vagy hiánya alapján következtet patofiziológiás elváltozásokra, hanem egy adott glikoprotein izoformjai alapján. Az AGP genetikai variánsainak különböző megoszlása egészséges és daganatos betegségben szenvedő csoportokban a variánsok patológiás állapotban betöltött szerepét jellemzi. Kutatásaimmal célom az volt, hogy patológiás folyamatokban meghatározzam a genetikai variánsok szerepét az AGP koncentrációjának emelkedésében.

2. Céljaim második irányvonalát az AGP oligoszacharidok szintjén bekövetkező heterogenitások jellemzése képezte. A szerkezeti variabilitás leírása új analitikai módszer kifejlesztését igényelte, amely nemcsak a különböző monoszacharid-összetételű oligoszacharidok meghatározására alkalmas, hanem a megegyező molekulatömegű izoformok jelenlétéről is adatokkal szolgál. Kutatómunkám célja egy olyan HPLC-MS módszer kidolgozása volt, ami alkalmas az N-glikozilált glikoproteinek oligoszacharidjainak szerkezeti jellemzésére és információt nyújt az oligoszacharidok izoformjairól.

III. MÓDSZEREK

III. 1. Az AGP peptidek analízisére alkalmazott módszerek

III. 1. 1. Anyagok, eszközök

Anyagok

A folyadékkromatográfiához HPLC-tisztaságú eluenseket alkalmaztam. Az acetonitril a Sigma-Aldrich kft-től (Steinheim, Németország) származott. A desztillált víz Milli-Q Ultrapure Water System, Milli gradient készülékkel lett tisztítva (Millipore, Billerica MA, USA). Az emésztéshez alkalmazott RapiGest a Waters kft-től (Milford, MA, USA) származik. Az 1,4-ditio-DL-treitol (DTT), a jódacetamid és a trifluoroecetsav a Sigma-Aldrich kft-től lett beszerezve. A standardként alkalmazott AGP, a tripszin, az ammónium-hidrogénkarbonát és a leucin-enkefalin a Sigma-Aldrich kft-től származnak. A humán AGP minták az Országos Onkológiai Intézetből és MTA Kémiai Kutatóközpont Biomolekuláris Kémiai Intézetéből származtak.

Eszközök, módszerek

A folyadékkromatográfiás analízist megelőzően a minták Table Top Refrigerated Centrifuge Hermle Z300K (Hermle Labortechnik Gmbh, Wehingen, Németország) készüléken lettek centrifugálva. A folyadékkromatográfiás mérés 100 µm x 100 mm BEH C18, 1,7 µm nanooszlopon valósult meg, nanoAcquity UPLC rendszer alkalmazásával (Waters kft.). A tömegspektrometriás analízis Waters Q-Tof Premier tömegspektrométeren (Waters kft.) történt. A kromatogramok és spektrumok felvétele és elemzése a MassLynx version 1.4 szoftver (Waters kft.) alkalmazásával történt. A peptidek azonosítása Protein Lynx Global Server (Waters kft.) és Mascot search szoftverekkel valósult meg. Az adatok elemzését a QuanLynx szoftver (Waters kft.), a Statistica és a Microsoft Excel is segítette.

III. 1. 2. Humán AGP minták

A humán AGP minták egészséges önkéntesektől és kórházi ellátásban részesülő, daganatos betegségben szenvedő betegektől származtak. A vérmintákat antikoagulánsokkal nem kezelték, a szobahőmérsékleten bekövetkező spontán koagulációt követően a szérumot centrifugálással nyerték ki a mintákból. A szérumokat -20 ºC-on tárolták a további kezelés megkezdéséig. A daganatos betegek mintáit további három csoportra osztották a betegségtípusnak megfelelően: limfómás, ovárium tumoros és melanómás mintacsoportokra. 16 fő tartozott az egészséges kontoll-csoportba, 15-15 fő a limfómások és ovárium tumorosok csoportjába és 13 fő a melanómásokhoz (1. táblázat). Referenciaként a 16 főből álló egészséges csoport értékei számítottak.

1. táblázat: A vizsgált csoportok adatai (Az átlagéletkor és az AGP koncentráció (g/l) oszlopok értékei az átlagértéket és a szórást tartalmazzák.)

vizsgált csoportok	létszám	férfiak száma	nők száma	életkor	átlagélet-kor	AGP koncentráció (g/l)
kontroll csoport	16	9	7	26 - 70	51,1 ± 13,8	0,49 ± 0,19
limfómás	15	6	9	22 - 69	40,1 ± 15,9	1,97 ± 0,67
ovárium tumoros	15	0	15	43 - 67	58,1 ± 6,7	2,05 ± 0,67
melanómás	13	10	3	35 - 72	49,5 ± 12,3	2,03 ± 0,48

III. 1. 3. Az AGP peptidekre hasítása tripszines emésztéssel

Az AGP minták peptidekre bontása tripszinnel történt. A fehérje (750 µg AGP) denaturálását 50mM-os NH_4HCO_3-os RapiGest segítette. A 750 µg mennyiségű AGP-hez 37,5 µl 0,2 w/v % RapiGest oldat került. A DTT-t és a jódacetamidot 100 mM-os NH_4HCO_3-os oldatban oldottam fel. A fehérje redukálásához 4,5 µl 45 mM –os DTT

került a mintaoldatba, 5mM-os végső DTT koncentrációt eredményezve az oldatban. A mintákat 60 ºC-on 30 percig termosztáltam a DTT hozzáadását követően. A fehérjeoldat alkilálása céljából a mintához 7,5 µl 100 mM –os jódacetamidot adtam, ami 15 mM-os végső jódacetamid koncentrációt eredményezett a mintaoldatban. A jódacetamidot is tartalmazó mintákat szobahőmérsékleten 30 percig sötétben tároltam. A fehérje peptidekre hasítását 37,5 µl frissen készített tripszinoldat hozzáadásával biztosítottam. 2,00 mg tripszin 1,00 ml HPLC-tisztaságú vízben történő feloldásával készítettem a tripszines oldatot. A tripszin mintához történő hozzáadását 37 ºC-on történő 60 perces inkubáció követte. A RapiGest elbontásához 7,5 µl 500 mM-os TFA-oldatot adtam a mintákhoz, amiket ezt követően 45 percen keresztül 37 ºC-on termosztáltam. A termosztálást a minták 10 percig tartó centrifugálása követte 13 000 rpm alkalmazásával. A centrifugálást követően a vízben oldhatatlan felülúszót eltávolítottam az oldatból, majd a megmaradó tiszta oldatot 100-szorosára hígítottam a HPLC-MS mérést megelőzően (56-58).

III. 1. 4. Az AGP peptidek HPLC-MS analízise

Nanoáramlásos folyadékkromatográfia

Az AGP peptidjeinek és glikopeptidjeinek elválasztása fordított fázisú, C18-as nanooszlopon történt NanoAcqiuty UPLC System kromatográfiás rendszer alkalmazásával. Az alkalmazott eluensekhez HPLC tisztaságú víz (0,1 % HCOOH) A eluensként és ACN (0,1 % HCOOH) tartozott B eluensként.
A folyadékkromatográfiás mérés alatt alkalmazott gradiens paraméterei a 2. táblázatban láthatók.

2. táblázat: A nanoUPLC gradiens

Idő (perc)	Áramlási sebesség (µl/perc)	A eluens aránya (%)	B eluens aránya (%)
0	0,4	99	1
1	0,4	99	1
25	0,4	60	40
45	0,4	40	60
46	0,4	5	95
50	0,4	5	95
51	0,4	99	1

5,0 µl mintamennyiség került egy injektálás során a nanooszlopra, ami közvetlenül kapcsolódott a tömegspektrométer elektrospray ionforrásához.

Tömegspektometriás paraméterek

Ionizációs mód:	Pozitív ionizáció
Kapilláris feszültség :	4,0 kV
Cone feszültség:	38,0 V
Forrás hőmérséklete:	90 ºC
Ütközési energia:	1,0 eV

400-2000 m/z-ig terjedő tömegtartományban készült spektrum pozitív ionizációs mód alkalmazásával. Egy scan ideje 1,0 sec.

A referenciaoldat 100 pg/µl-es leucin-enkefalin oldat, 1:1 arányú ACN: víz elegyében oldva; az oldószer 0,1 %-ban hangyasavat tartalmazott.

III. 2. Módszerfejlesztés az oligoszacharidok analízisére

III. 2. 1. Anyagok, eszközök

Anyagok

A folyadékkromatográfiához HPLC-tisztaságú eluenseket alkalmaztam. Az acetonitril, a 2-izopropanol eluensek a Sigma-Aldrich kft-től (Steinheim, Németország) származtak. A desztillált víz Milli-Q Ultrapure Water System, Milli gradient készülékkel lett tisztítva (Millipore, Billerica MA, USA). Az emésztéshez alkalmazott AGP, PNGáz F enzim, valamint a detergensek (az ammónium-hidrogénkarbonát, a nátrium-dodecilszulfát és β-merkaptoetanol) a Sigma-Aldrich kft-től származnak. A RapiGest oldat a Waters kft-től (Milford, MA, USA), a standardként alkalmazott szialil-Lewis-X a Sigma-Aldrich kft-től lett beszerezve.

Eszközök

A folyadékkromatográfiás analízist megelőzően a minták Table Top Refrigerated Centrifuge Hermle Z300K (Hermle Labortechnik Gmbh, Wehingen, Németország) készüléken lettek centrifugálva, bepárlásuk miVac Duo Concentrator vákuumbepárló készülékben (Genevac LTD, England) történt. A minták tisztítása grafittöltetű SPE oszlopokon (Porous Graphitized Carbon, PGC SPE, Hypersep Hypercarb column; Thermo Electron Corporation), C18-as töltetű SPE oszlopokon (Millipore), illetve Sephadex G-25-ös géllel töltött oszlopokon (GE HealthCare, UK) történt. A folyadékkromatográfiás mérés 100 μm x 100 mm BEH C18, 1,7 μm nanooszlopon, illetve Hypercarb 100 x 1,0 mm, 3 μm; (Thermo Electron Corporation) grafitoszlopon valósult meg, nanoAcquity UPLC rendszer alkalmazásával (Waters kft., Milford, MA, USA). A tömegspektrometriás analízis Waters Q-Tof Premier tömegspektrométeren (Waters kft.) történt. A kromatogramok és spektrumok felvétele és elemzése a MassLynx version 1.4 szoftver (Waters kft.) alkalmazásával történt, az értékelést a Microsoft Excel segítette.

III. 2. 2. Az oligoszacharidok hasítására alkalmazott módszer fejlesztése

Az oligoszacharidok glikoprotein mintából történő kinyerése az alábbi protokollok alkalmazásával történt. A módszerfejlesztés során három protokollt mutatok be az AGP N-glikánjainak hasítására. A hasításra alkalmas protokollok közül a leghatékonyabbnak bizonyult módszert az alkalmazott módszerek fejezetben mutatom be.

1. protokoll

500 µg AGP glikoprotein 160 µl HPLC tiszta vízben került feloldásra. A glikoprotein vizes oldatát 10 percig 100 ºC-on termosztáltam denaturálás céljából. Az oldat szobahőmérsékletre történő lehűtését követően 40 µl 100 mM-os (pH: 8,2) ammónium-hidrogénkarbonát oldattal elegyítettem a mintaoldatot. A magas pH tartomány a PNGáz F enzim hatékony működését segítette elő. 500 µg denaturált AGP mintához 3 U (unit) PNGáz F enzim került, majd a glikoproteint tartalmazó mintát 37 ºC-on 48 órán keresztül termosztáltam. Az inkubációt követően a minta tisztításáig a mintaoldatot – 20 ºC-on tároltam. (51, 64-66).

2. protokoll

500 µg AGP glikoprotein 150 µl HPLC tiszta vízben került feloldásra. A mintaoldatot 150 µl 100 mM-os ammónium-hidrogénkarbonát oldattal elegyítettem, ami 2 mM-os volt etiléndiamin-tetraecetsavra (EDTA) nézve (pH: 7,6). A mintaoldathoz 6 µl 5 %-os nátrium-dodecilszulfát (SDS)-oldatotot és 8 µl béta-merkaptoetanolt adtam. A béta-merkaptoetanol mintához hozzáadott oldata 1:10 arányban, HPLC tiszta vízzel hígítva frissen készült. A detergensek hozzáadását követően a mintaoldatot 10 percig 100 ºC-on termosztáltam a denaturáció elősegítésére. A szobahőmérsékletre történő lehűtést követően a minták 0-10 ºC közötti hőmérsékleten történő 5-10 perces tárolása következett. A tárolást követően ahhoz, hogy a precipitálódott SDS-t eltávolítsam, a mintákat 5000 rpm alkalmazásával 10 percig centrifugáltam. A centrifugálás után a minta felülúszóját külön mintatartókba gyűjtöttem. A felülúszóhoz egy mintatartóba 3 U PNGáz F enzim került az oligoszacharidok hasítására. Az PNGáz F enzim

működésének elősegítésére a mintákat az emésztés 48 órája alatt 37 ºC-on termosztáltam. A 48 órás emésztést követően a mintákat – 20 ºC-on tároltam (56-58).

3. protokoll

500 µg AGP glikoprotein 135 µl HPLC tiszta vízben került feloldásra. A glikoprotein vizes oldatát 10 percig 100 ºC-on termosztáltam denaturálás céljából. Az oldatot szobahőmérsékletre történő lehűtését követően 40 µl 100 mM-os (pH: 8,2) ammónium-hidrogénkarbonát oldattal elegyítettem. 1 mg RapiGest-et 500 µl 50 mM-os ammónium-hidrogénkarbonát oldatban oldottam, amiből 25 µl került az AGP emésztmény oldatához. 500 µg denaturált AGP mintához 3 U (unit) PNGáz F enzim került, majd a mintát 37 ºC-on 48 órán keresztül termosztáltam. Az inkubációt követően a mintákat – 20 ºC-on tároltam (61-65).

Az első bemutatott recept előnye, hogy nem tartalmaz denaturáló szereket. A denaturálás a hőmérséklet 100 ºC-ra történő emelésével valósul meg.

A 2. recept fő különbsége az elsőhöz viszonyítva az, hogy a glikoprotein PNGáz F enzimes hasítását megelőzően a glikoprotein denaturálását detergensekkel segíti elő. Az alkalmazott detergensek (EDTA, SDS és béta-merkaptoetanol) a tömegspektrometriás detektálás alatt szennyezőként jelenhetnek meg elégtelen tisztítási lépést követően.

A 3. receptben az AGP denaturációját a RapiGest oldat segíti az oligoszacharidok hasítását megelőzően. A 2. és 3. protokollok legfőbb eltérései a különböző denaturáló szerekből adódnak.

III. 2. 3. Az oligoszacharidok tisztítása

Az oligoszacharidok tisztítására a módszerfejlesztés alatt gélkromatográfiás módszert is alkalmaztam. Dextrán alapú Sephadex G-25-ös géllel töltött oszlopon történő tisztítás és elválasztás nem vezetett eredményre. Oligoszacharidokat nem detektáltam a gélkromatográfiával elválasztott mintákból. C18-as töltetű szilárd fázisú extrakciós módszerrel (SPE) sem sikerült az oligoszacharid minta tisztítása. A kezdeti

próbálkozások sikertelensége, illetve a grafittöltetű SPE oszlopok sikeres alkalmazása miatt a módszerfejlesztés és optimalizálás mintaelőkészítést követő lépéseit, az SPE tisztítást grafittöltet alkalmazásával végeztem.

A bemutatott SPE módszerek mindegyike grafittöltetű oszlopokon végzett kísérleteket jelent.

A bemutatott SPE-tisztítás lépcsői:
- Kondícionálás: 100% ACN (2000 µl)
- Vizes mosás: HPLC tisztaságú víz (2000 µl)
- Mintafelvitel (250 µg AGP glikoproteinnek megfelelő mintaoldat)
- Vizes mosás a detergensek, sók eltávolítására: HPLC tisztaságú víz (1500 µl)
- Eluálás: a módszerfejlesztés során különböző eluensekkel (1000 µl)

A tisztítási folyamat optimalizálására az AGP emésztmény esetében az eluáló oldószerek különböző arányú és különböző pH-jú, illetve különböző savtartalmú keverékei kerültek analízisre (65, 67).

Az eluáló folyadék esetében alkalmazott eluens oldószerek aránya:

- 10 % ACN és 90 % víz, ami 0,1 % TFA-t tartalmazott
- 25 % ACN és 75 % víz, ami 0,1 % TFA-t tartalmazott
- 40 % ACN és 60 % víz, ami 0,1 % TFA-t tartalmazott

Az oligoszacharidok grafitoszlopról történő elúciójához a 25 % ACN és 75 % víz arányú elegy bizonyult a leghatékonyabbnak. A további optimálási lépések esetében az az adott arányú elegyet alkalmaztam.

Az eluáló folyadék pH-ja, ill. hozzáadott savtartalma alapján:

- 25 % ACN és 75 % víz, ami 0,1 % TFA-t tartalmazott
- 25 % ACN és 75 % víz, ami 0,1 % hangyasavat tartalmazott
- 25 % ACN és 75 % víz, hozzáadott sav nélkül
- 25 % ACN és 75 % víz, ami 0,1 % NH_4HCO_3–ot tartalmazott

A sav nélküli eluens nem bizonyult hatékonynak a sziálsav-tartalmú oligoszacharidok eluálása esetében. A sziálsavas oligoszacharidok savtartalmú, illetve NH_4HCO_3–ot tartamazó eluensekkel eluálódnak nagyobb hatékonysággal. Az oligoszacharidok grafitoszlopról történő eluálásához a 0,1 % hangyasavat tartalmazó rendszer bizonyult a leghatékonyabbnak.

III. 2. 4. Az oligoszacharidok folyadékkromatográfiás analízise

Fordított fázisú kromatográfia nano-oszlopon

Kromatográfiás paraméterek:
A eluens: víz (0,1 % HCOOH)
B eluens: acetonitril (0,1 % HCOOH)

3. táblázat: Gradiens az oligoszacharidok vizsgálatára fordított fázisú oszlopon

Idő (perc)	Áramlási sebesség (µl/perc)	A eluens aránya (%)	B eluens aránya (%)
0	0,4	99	1
2	0,4	85	15
30	0,4	60	40
31	0,4	20	80
40	0,4	20	80
41	0,4	99	1
50	0,4	99	1

Tömegspektrometriai paraméterek fordított fázisú HPLC-MS mérésnél:

Ionizációs mód: Pozitív ionizáció
Kapilláris feszültség : 4,0 kV
Cone feszültség: 38,0 V
Forrás hőmérséklete: 90 ºC
Ütközési energia: 1,0 eV

Az oligoszacharidok analízise grafitoszlopon

Alkalmazott eluensek a kromatográfiás módszer fejlesztésére:

- A eluens: HPLC tisztaságú víz 100 %
  B eluens: ACN : HPLC tisztaságú víz 1:1 arányú elegye

- A eluens: 5 mM ammónium-acetát vízben, pH: 9,6
  B eluens: ACN : HPLC tisztaságú víz 1:1 arányú elegye

- A eluens: 5 mM ammónium-acetát vízben, pH: 9,6
  B eluens: ACN : 2-izopropanol 1:1 arányú elegye

- A eluens: 5 mM ammónium-acetát vízben, pH: 9,6
  B eluens: ACN : 2-izopropanol 1:3 arányú elegye

- A eluens: 5 mM ammónium-acetát vízben, pH: 9,6
  B eluens: MeOH : 2-izopropanol 1:1 arányú elegye

Az eluensekhez hozzáadott additív, az 5 mM-os ammónium-acetát az oligoszacharidok elválasztása esetében a kromatográfiás felbontást javítja grafitoszlopon történő elválasztásnál. A módszerfejlesztés során kipróbált szerves eluensek oligoszacharidokra vonatkozó elúciós ereje különböző.

Eluensek eluotróp hatása: MeOH < ACN < ACN:IPA (1:1) < ACN:IPA (1:3) < THF = DCM

A metanol eluotróp ereje a legkisebb a grafitoszlopon. A metanolnál erősebb az acetonitril, még eluotrópabb az izopropanol és a tetrahidrofurán, valamint a diklórmetán.

A kutatás során az oligoszacharidok elválasztására legalkalmasabb eluenselegynek az ACN:2-izopropanol 1:1 arányú elegye bizonyult. A magasabb 2-izopropanol tartalmú elegy esetében az oligoszacharidok elúciója rövidebb idő alatt következik be, de az elválasztás hatékonysága jelentősen csökken, mint az 1:1 arányú ACN: 2-izopropanol elegy alkalmazásánál. Magas 2-izopropanol tartalmú elegyet alkalmazva, a különböző

molekulatömegű oligoszacharidok esetében koelúció lép fel. Metanol tartalmú B eluens alkalmazása esetén az oligoszacharidok retenciós ideje megnő, az 1:1 arányú ACN: 2-izopropanol elegy alkalmazásához viszonyítva. A metanol tartalmú elegy alkalmazása esetén a kromatográfiás felbontás romlik (69-77). Az 5 mM ammónium-acetát és 1:1 arányú ACN : 2-izopropanol eluensek alkalmazásával a legkedvezőbb a kromatográfiás felbontás az oligoszacharidok analízisére - a módszerfejlesztésben bemutatott eluensek közül.

Különböző gradiensek alkalmazása az elválasztás optimalizálására

A módszerfejlesztés során alkalmazott főbb gradienseket mutatom be az alábbi fejezetben és a gradiensben tett változtatások hatását írom le az oligoszacharidok elúciójára vonatkozóan.

A bemutatott gradiensek esetében az alkalmazott eluensek:
A eluens: 5 mM ammónium-acetát vízben, pH: 9,6
B eluens: ACN : 2-izopropanol 1:1 arányú elegye

A. gradiens
A 4. táblázatban bemutatott A gradiens az oligoszacharidok analízisének kiindulópontját jelentette.

4. táblázat: A. gradiens

Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	A eluens aránya (%)	B eluens aránya (%)
0	0,05	94	6
3	0,05	94	6
25	0,05	85	10
26	0,05	80	20
50	0,05	80	20

B. gradiens

A B eluens aránya 15 %-ig nő az első 25 perc alatt. A B eluens, azaz a szerves oldószerek arányának növekedése gyorsabb, mint az A gradiens esetében (5. táblázat). A szerves oldószer-tartalom arányának növelése az oligoszacharidok retenciós idejének csökkentése miatt történt. A szerves eluens-tartalom növekedése elősegíti az oligoszacharidok elúcióját a grafitoszlopról és csökkenti retenciós idejüket.

5. táblázat: B. gradiens

Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	A eluens aránya (%)	B eluens aránya (%)
0	0,05	94	6
3	0,05	94	6
25	0,05	85	15
26	0,05	80	20
50	0,05	80	20

C. gradiens

A kiindulási B eluens arány magasabb a C gradiens esetében (6. táblázat). A B eluens arányának növelése az oligoszacharidok retenciós idejének csökkentése miatt történt. 8 % -os kiindulási B eluens-arány esetén az oligoszacharidok csúcsainak elválása nem következik be egyes oligoszacharidok esetében. Az oligoszacharidok csúcsai összeolvadnak, grafitoszlopról történő elúciójuk egy időben következik be.

6. táblázat: C. gradiens

Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	A eluens aránya (%)	B eluens aránya (%)
0	0,05	92	8
3	0,05	92	8
25	0,05	85	15
26	0,05	80	20
50	0,05	80	20

D. gradiens

Ahhoz, hogy a kromatográfiás felbontás javuljon és az oligoszacharidok elúciója ne egyszerre következzen be a 6 %-os kiindulási B eluens arány ajánlott. A B eluens aránya a kromatográfiás futás alatt emelkedik 30 %-ra az 50. percben (7. táblázat). A B eluens arányának 30 %-ig történő emelkedése ahhoz járul hozzá, hogy a nagyobb molekulatömegű és három-, négyantennás oligoszacharidok elúciója is bekövetkezzen az 50 perces kromatográfiás futás során.

7. táblázat: D. gradiens

Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	A eluens aránya (%)	B eluens aránya (%)
0	0,05	94	6
3	0,05	94	6
25	0,05	85	15
26	0,05	80	20
50	0,05	70	30

Hőmérséklet hatása a grafitoszlopos analízisre

A kromatográfiás módszerfejlesztés során a hőmérséklet emelésére bekövetkező nyomásváltozásokat is vizsgáltam különböző áramlási sebességnél. Ahhoz, hogy az oligoszacharidok elválasztására fejlesztett kromatográfiás futás időtartamát rövidítsük, az áramlási sebességet lehet megnövelni és így elérni az oligoszacharidok rövidebb idő alatt bekövetkező elúcióját. Az áramlási sebesség növelésénél azonban figyelembe kell venni a kromatográfiás rendszer nyomástűrő képességét. Az áramlási sebesség emelésével a rendszer nyomása is emelkedik. A hőmérséklet emelésével azonban a mozgó fázis viszkozitása csökken és így nagyobb áramlási sebesség alkalmazható a gyorsabb elválasztás eléréséért anélkül, hogy a HPLC rendszer nyomása nagymértékben emelkedne. Az analízis sebessége 10-15-szeresére növelhető a hőmérséklet emelésével. A hőmérséklet 200 ºC-ra növelhető grafitoszlopok esetében.

Alkalmazott hőmérsékletek a grafitoszlop termosztálására:

24 º C és 65 º C

Alkalmazott áramlási sebesség értékek:

0,05 ml/perc és 0,10 ml/perc

8. táblázat: Hőmérséklet hatása a nyomásváltozásra grafitoszlopon

Hőmérséklet (ºC)	**Áramlási sebessség (ml/perc)**	**Nyomás (psi)**	**A eluens aránya (%)**	**B eluens aránya (%)**
24	0,05	3200	94	6
24	0,05	3600	80	20
65	0,05	1700	94	6
65	0,05	2300	80	20
65	0,1	3200	94	6
65	0,1	3700	80	20

A 8. táblázatban látható, hogy a hőmérséklet 65 ºC- ra történő növelése esetén az áramlási sebesség 0,1 ml/perc-re növelhető, a nyomás jelentősebb emelkedése nélkül. Az oligoszacharidok grafitoszlopon történő elválasztásának hatékonysága és a kromatográfiás felbontás azonban romlik magas hőmérsékleten és csúcsszélesedés lép fel. A van Demteer összefüggés vagy sebességi elmélet alapján a csúcsszélesedést az áramlási sebesség emelkedése, illetve a diffúziós tag növekedése okozhatja. Azért, hogy az oligoszacharidok koelúcióját elkerüljük érdemes alacsony hőmérsékleten (24 ºC), alacsony áramlási sebesség (0,05 ml/perc) alkalmazása mellett analizálni a mintát.

III. 3. Az oligoszacharidok analízisére kidolgozott módszer

III. 3. 1. Oligoszacharidok mintaelőkészítése

Enzimatikus hasítás

Az oligoszacharidok glikoproteinről történő lehasítása enzimatikus módszerrel PNGáz F enzimmel történt. 500 µg AGP glikoprotein 100 µl HPLC tiszta vízben történő feloldását követően a fehérjeoldatot 125 µl 100 mM-os NH_4HCO_3 - oldattal (pH: 8,2) és 6,5 µl denaturáló oldattal elegyítettem. A denaturáló oldat összetétele: 2 g/100 ml SDS és 1 M β-merkaptoetanol. A mintaoldatot 100 ºC-on 10 percig termosztáltam. Az oldat szobahőmérsékletre történő lehűtése után 3U (unit) PNGáz F enzimet adtam az oligoszacharidok mintaoldataihoz. A denaturált glikoproteinhez a PNGáz F enzim hozzáadását követően a mintaoldatokat 37 ºC-on termosztáltam három órán keresztül. Az inkubációt követően a mintaoldatokat - 20 ºC-on tároltam a tisztításig.

Tisztítás szilárd fázisú extrakcióval

Az AGP-ről lehasított oligoszacharidokat grafittöltetű oszlopokkal, szilárd fázisú extrakcióval tisztítottam. A grafittöltetű SPE oszlopok kondícionálása 2000 µl 100 % acetonitrillel történt. A kondícionálást az SPE oszlopok vizes mosása követte, 2000 µl HPLC tisztaságú vízzel. A PNGáz F enzimmel emésztett mintaoldatból 115 µl, - ami hatékony enzimműködést feltételezve 100 µg lehasított oligoszacharidnak felel meg - került egy SPE oszlopra. A minta felvitelét követően az SPE oszlopot 1500 µl HPLC tisztaságú vízzel tisztítottam a detergensek és sók eluálására. Az oligoszacharidok elúciója az SPE oszlopról a vizes mosást követően 1000 µl 0,1 %-ban hangyasavat tartalmazó eleggyel, acetonitril (25 %) és víz (75 %) keverékével történt.
Az SPE tisztást követően az eluált minták vákuumbepárlóban száradtak, majd a teljes száradást követően 3000 µl HPLC tisztaságú vízben oldottam fel a mintákat.
Glikánok koncentrációja: 3 µg glikán/100 µl vízben = 10 pmol glikán /µl.
A leírt SPE-tisztítás lépcsői:

- Kondícionálás: 100% ACN (2000 µl)
- Vizes mosás: HPLC tisztaságú vízzel (2000 µl)
- Mintafelvitel (115 µl PNGáz F-es emésztmény - az alkalmazott módszerek fejezet szerinti protokollból)
- Vizes mosás a detergensek, sók eltávolítására: HPLC tisztaságú vízzel (1500 µl)
- Eluálás: 25 % (v/v) ACN és 75 % (v/v) víz, amiben 0,1 % (v/v) a HCOOH (1000 µl)
HPLC oszlopra injektált mennyiség: 10 µl.

III. 3. 2. Oligoszacharidok PGC-MS analízise

Az oligoszacharidok folyadékkromatográfiás elválasztását grafitoszlopon Acquity UPLC készülékkel végeztem. A grafitoszlop kondícionálása metanol:víz 95:5 arányú elegyével történt. A kondícionálás az oszloptérfogat 20-szoros mennyiségével ajánlott, 100 µl/perc-es áramlási sebességnél 20 percig az alkalmazott grafitoszlopon.
Oszlop maximális nyomástűrő képessége: 400 bar = 5800 psi.
A mérés során alkalmazott 50 µl/perc-es áramlási sebesség a 3500 - 3600 psi tartományban mozgott. Az oszlop tárolás előtti mosása acetonitril:izopropanol 1:1 arányú eleggyel történt.

Folyadékkromatográfiás paraméterek

Optimális paraméterek:
A eluens: 5mM ammónium-acetát vizes oldata (pH = 9,6)
B eluens: ACN: izopropanol = 1:1
Hőmérséklet: 24 °C;
Áramlási sebesség: 50 µl/perc

A PGC oszlopra injektált mintamennyiség: 10 µl, ami 100 pmol hasított oligoszacharidnak felel meg hatékony PNGáz F enzimműködést feltételezve. Az oligoszacharidok analízisére alkalmazott gradiens a 9. táblázatban látható. Az injektált minta koncentrációja: 10 pmol/µl.

9. táblázat: Gradiens az oligoszacharidok analízisére grafitoszlopon

Idő (perc)	Áramlási sebesség (ml/perc)	A eluens aránya (%)	B eluens aránya (%)
0	0,05	94	6
3	0,05	94	6
40	0,05	70	30
50	0,05	70	30
51	0,05	94	6
71	0,05	94	6

Detektálás tömegspektrométerrel

A tömegspektometriás detektálás Waters Micromass Q-Tof Premier tömegspektrométerrel történt.

Tömegspektometriai paraméterek:

Ionizációs mód: Negatív ionizáció

Kapilláris feszültség : 2,6 kV

Cone feszültség: 35,0 V

Forrás hőmérséklete: 120 ºC

Ütközési energia: 3,0 eV

A mintaoldat áramlási sebessége: 5 µl/perc direkt injektálás esetén. 800-2000 m/z-ig terjedő tömegtartományban készült spektrum negatív ionizációs mód alkalmazásával.

IV. EREDMÉNYEK

IV. 1. Genetikai variánsok vizsgálata

Kutatásaim két irányvonala az AGP genetikai variánsainak vizsgálatára és az AGP oligoszacharidjainak analízisére tagolódott. Az eredmények bemutatását az AGP genetikai variánsainak vizsgálatánál nyert eredményekkel kezdem ismertetni, majd külön alfejezetben mutatom be az oligoszacharidok analízisére kifejlesztett HPLC-MS technikát.

Az AGP genetikai variánsainak tanulmányozását tűztem ki célul fiziológiás és patológiás állapotokban. Kutatásaim során a genetikai variánsok arányának meghatározását végeztem el egészséges és rákban szenvedő betegek esetében. Limfómás, ovárium tumoros és melanómás betegek esetében kerültek összehasonlításra az AGP minták. Az egészséges kontroll csoportba 16 fő mintája tartozott, amik a három rákban szenvedő betegek csoportjaival lettek összehasonlítva. A limfómás csoportot 15 fő AGP mintája alkotta, szintén 15 fő tartozott az ovárium tumoros csoportba és 13 fő a melanómásokhoz. Ahhoz, hogy az irodalomban fellelhető ellentmondásos adatok egyértelműbbé váljanak, továbbá azért, hogy jobban megismerjük a genetikai variánsok hozzájárulását az AGP plazmaszintjének emelkedéséhez, egy új analitikai módszerrel vizsgáltuk meg az AGP genetikai variánsainak expresszióját. A genetikai variánsok analízise az AGP tripszines emésztését követően nanoáramlásos folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás detektálással történt. A nanoáramlásos folyadékkromatográfia jobb érzékenységet biztosít a normál áramlású folyadékkromatográfiás rendszerekhez képest. Az AGP genetikai variánsainak és a genetikai variánsok relatív arányának meghatározása valósult meg egészséges kontroll csoport és rákban szenvedő betegek esetében.

IV. 1. 1. Peptidek azonosítása tömegspektrometriával

Az AGP tripszines emésztését követően 21 peptid azonosítása pontos tömegük meghatározásával történt. A 21 peptidből 14-et tandem MS technikával is azonosítottunk. A tandem tömegspektrometriás detektálás a fennmaradó 7 peptid esetében a fragmensek kismértékű intenzitása miatt nem volt lehetséges.

Az AGP 21 peptidjének meghatározása és azonosítása a tripszines emésztményből 78 % szekvencia lefedettséget mutatott. A detektált peptidek közül számos glikozilált peptid, legnagyobb mennyiségben a két- és háromantennás, teljes mértékben szializált oligoszacharidok lettek detektálva. A 10. táblázat mutatja az azonosított peptideket, a retenciós időket, valamint a peptidhez rendelhető genetikai variánst. Az AGP különböző genetikai variánsai különböző peptid fragmenseket eredményeznek az aminosav-szekvencia eltérő tulajdonságai miatt. Egyes peptidek az ORM1 variánsokra, mások az ORM2 variánsához rendelhetők. A különböző variánsokhoz rendelhető peptidpárok a genetikai variánsok arányáról nyújthatnak információt.

10. táblázat: Az UPLC-MS módszerrel azonosított peptidek (A: AGP A variáns, F1: AGP F1 variáns, F2: AGP F2 variáns, S: AGP S variáns)

Sorszám	Szekvencia	Retenciós idő (perc)	Genetikai variáns
1	(26)LVPVPITNATLDR(38)	24,79	A, S
2	(26)LVPVPITNATLDQITGK(42)	27,29	F1, F2
3	(43)WFYIASAFR(51)	28,9	A
4	(52)NEEYNK(57)	14,59	A
5	(58)SVQEIQATFFYFTPNK(73)	29,25	A
6	(74)TEDTIFLR(81)	23,8	A
7	(87)QNQCFYNSSYLNVQR(101)	30,32	A, S
8	(87)QNQCIYNTTYLNVQR(101)	23,7	F1, F2
9	(102)ENGTVSR(108)	14,02	A, S
10	(102)ENGTISR(108)	14,98	F1, F2
11	(109)YVGGQEHFAHLLILR(123)	28,8	S, F1, F2
12	(114)EHVAHLLFLR(123)	24,24	A
13	(127)TLMFGSYLDDEK(138)	26,4	A
14	(127)TLMLAFDVNDEK(138)	25,6	S, F1, F2
15	(139)NWGLSFYADKPETTK(153)	25,35	A
16	(139)NWGLSVYADKPETTK(153)	23,5	S, F1, F2
17	(154)EQLGEFYEALDCLCIPR(170)	29,85	A
18	(154)EQLGEFYEALDCLR(167)	28,8	S, F1, F2
19	(171)SDVMYTDWK(179)	22,95	A, F2
20	(171)SDVVYTDWKK(180)	20,71	F1, F2
21	(39)ITGKWFYIASAFR(51)	27,64	A, S

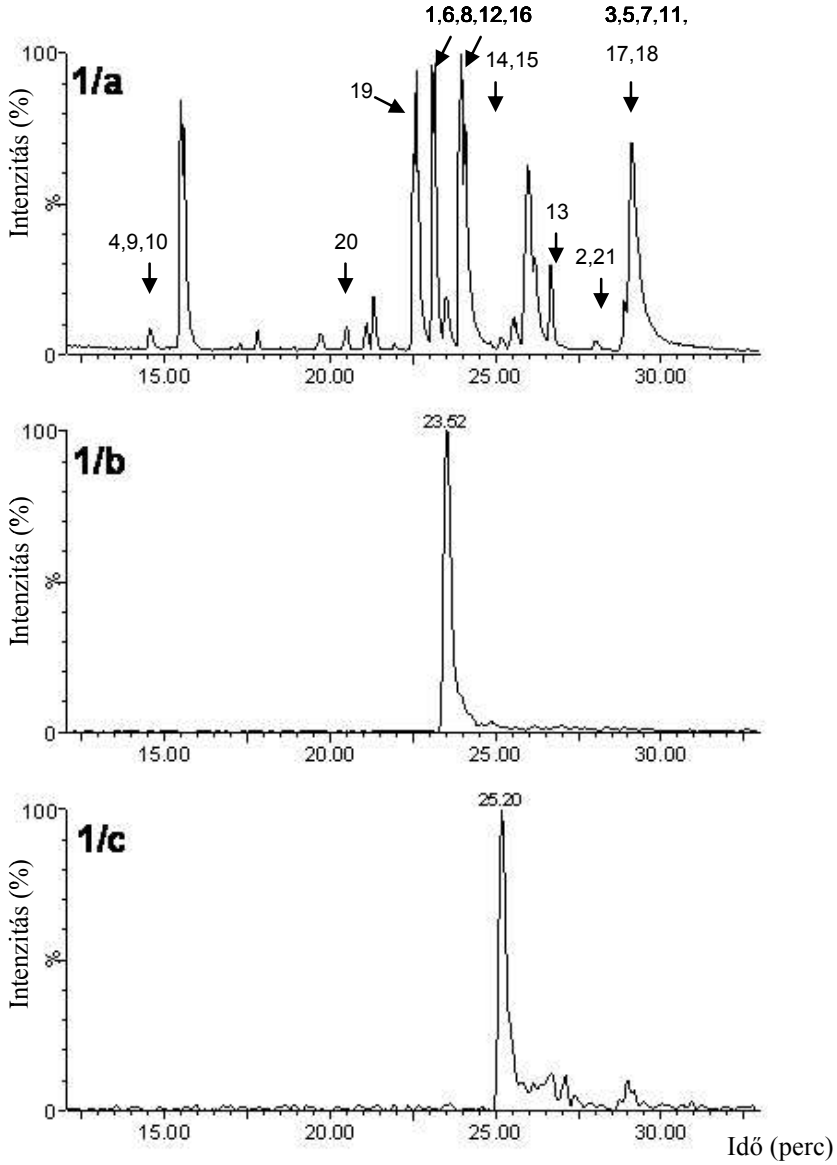
IV. 1. 2. A genetikai variánsok arányának meghatározása

A variánsok arányának meghatározásához az ORM1 és ORM2 százalékos előfordulása és az ORM2/ORM1 arány lett meghatározva. Két peptid kiválasztásával – amelyek közül az egyik az ORM1, a másik az ORM2 genetikai lókuszon expresszálódó peptid - az ORM1 és ORM2 variánsok relatív aránya jellemezhető és össszehasonlítható. Az ORM1 genetikai lókuszhoz tartozó három genetikai variáns az AGP F1, AGP F2 és AGP S egy peptidje az alábbi aminosav szekvenciával rendelkezik:

^{139}NWGLS^{144}VYADKPETTK^{153}. Az ORM2 genetikai lókuszhoz tartozó AGP A genetikai variáns peptidje egy aminosavban tér el a bemutatott szekvenciától: ^{139}NWGLS^{144}FYADKPETTK^{153}. Az egy aminosavban megmutatkozó különbség a V, valin aminosav helyett az F, fenilalanin aminosavat jelöli. A két kiválasztott peptid esetében, mivel azok szekvenciája csak egy aminosavban tér el, hasonló tömegspektrometriai paraméterek mellett hasonló érzékenység várható. A genetikai variánsokat jellemző egyéb peptidpárok esetében az aminosavakban tapasztalható eltérés 7-10 aminosav számában is megmutatkozhat, ami eltérő detektálási jelleghez, eltérő érzékenységhez vezethet, ami a genetikai variánsok arányának relatív összehasonlítását és az eredmények ismételhetőségét megnehezíti.

A két kiválasztott peptid (^{139}NWGLS^{144}VYADKPETTK^{153}, ^{139}NWGLS^{144}FYADKPETTK^{153}) detektálása kétszeresen és háromszoroson töltött ion formájában is lehetővé vált. A kiválasztott peptidek a fordított fázisú oszlopon elválnak egymástól: a ^{139}NWGLS^{144}VYADKPETTK^{153} peptid ion kromatogramjának a csúcsa 23,5 percnél, a ^{139}NWGLS^{144}FYADKPETTK^{153} peptid ion kromatogramjának a csúcsa 25,2 percnél detektálható.

A 9. ábra egy egészséges egyéntől származó tripszinnel emésztett AGP minta totál ion kromatogramját és a két kiválasztott peptid ion kromatogramjait mutatja be.



9. ábra: 1/a Totál ion kromatogram, 1/b a ^{139}NWGLS^{144}VYADKPETTK^{153} peptid ion kromatogramja, 1/c a ^{139}NWGLS^{144}FYADKPETTK^{153} peptid ion kromatogramja

Az ion kromatogramokon látható, hogy a kiválasztott peptidek kromatogramjain a jel/zaj arány kedvező, így a peptidek csúcsainak aránya felhasználható a genetikai variánsok arányának meghatározására. Az ORM1 és ORM2 genetikai variánsok relatív mennyiségét lehet megbecsülni a két kiválasztott peptid ion kromatogramjain meghatározott csúcsterületek mérésével. A kiválasztott kettő peptid

(^{139}NWGLS^{144}VYADKPETTK^{153}, ^{139}NWGLS^{144}FYADKPETTK^{153}) minden spektrumban azonosítható és így a genetikai variánsok relatív aránya összehasonlítható a vizsgált csoportok esetében.

A kiválasztott peptidek azonosítása tandem MS mérések segítségével történt. A tandem MS mérések eredményei Mascot peptidkereső program segítségével is értékelve voltak. A Mascot program alkalmas arra, hogy azonosítson fehérjéket az elsődleges aminosav-szekvenciájuk alapján, tömegspektrumok adatainak felhasználásával, az adatbázisán alapulva. A ^{139}NWGLS^{144}VYADKPETTK^{153} aminosav-szekvenciájú peptid - ami az ORM1 lókuszt jellemzi - Mascot programmal kapott pontértéke 63,9 és a delta értéke – 0,0154. A ^{139}NWGLS^{144}FYADKPETTK^{153} aminosav-szekvenciájú peptid - az ORM2 genetikai lókusz jellemzésére – Mascot pontértéke 43,5 és delta értéke 0,0038. A Mascot program által nyújtott pontérték a definíció alapján -10* LOG_{10} (P), ahol P annak a valószínűségi értéke, hogy az észlelt és azonosított peptid szekvencia találat egy random választás következménye. Mascot programot használva a 38-nál nagyobb értékű pontszámmal rendelkező peptidek azonosítottnak tekinthetők. A delta érték a kísérleti, azaz experimentális és az elméleti, kalkulált adatok közötti eltérés jellemzésére szolgál. Minél kisebb érték a delta, annál jobban megfelelnek a kísérleti mérések az elméleti, kalkulált adatoknak.

A tömegspektrometriát gyakran alkalmazzák kvantitatív meghatározásra. A kvantitatív meghatározás belső standard minták felhasználását igényli. Belső standardként izotóp-jelzett vegyületet alkalmaznak, de a meghatározandó mintához kémiai tulajdonságaiban hasonló vegyület is alkalmazható standardként. A bemutatott kutatás során az egymással nagyon hasonló szerkezetű, egy aminosavban különböző peptidpárok arányának meghatározása nem kvantitatív mérés, azonban a genetikai variánsok relatív arányáról közelítést nyújt (50).

Az eredmények alapján – az ORM1 és ORM2 variánsok összmennyiségét 100 %-nak tekintve – az ORM1 variánsok százalékos előfordulása az egészséges, kontrollként mért csoportban 76,3 % ± 8,2 %, abban az esetben, ha a kiválasztott peptidpárokat (^{139}NWGLS^{144}VYADKPETTK^{153}, ^{139}NWGLS^{144}FYADKPETTK^{153}) tekintjük a meghatározás alapjának. Ahhoz, hogy a mérés pontosságát ellenőrizzük, egy másik peptidpárt választottunk, amik 7 aminosavban különböznek egymástól (^{127}TLMFGSYLDDEK^{138} és ^{127}TYMLAFDVNDEK^{138}). Az újonnan választott

peptidpár a 7 aminosavnyi eltérés miatt nem alkalmasabb a genetikai variánsok arányának becslésére. Az ORM1 genetikai variánsok aránya 82 %-nak adódott az egymástól 7 aminosavban eltérő peptidpár alapján. Újabb peptidpár (^{154}EQLGEFYEALDCLCIPR^{170}, ^{154}EQLGEFYEALDCLR^{167}) mérése esetén az ORM1 variánsok százalékos előfordulása 64 %-nak adódott. Korábbi irodalmi adatok alapján - bár a meghatározáshoz alkalmazott módszer különböző - az ORM1 variánsok aránya 67 % (17-18). Az ORM1 genetikai variánsok megoszlására vonatkozó adatok azonban azt mutatják, hogy a kiválasztott peptidpárok UPLC-MS mérésével a genetikai variánsok aránya megbecsülhető. A mérés izotóp-jelzett standard hiányában nem tekinthető kvantitatívnak, azonban az ORM1 és ORM2 variánsok arányáról becslést nyújt.

Reprodukálhatóság

Standardként kereskedelmi humán AGP-t (Sigma Aldrich Gmbh) alkalmaztam. A retenciós idők reprodukálhatósága akár a totál ion kromatogramot, akár az ion kromatogramot vizsgálva kisebb volt, mint 0,1 perc. Kétszeres és háromszoros töltésű peptidek (^{139}NWGLS^{144}FYADKPETTK^{153}, ^{139}NWGLS^{144}VYADKPETTK^{153}) ion kromatogramjain a csúcsarányokat figyelembe véve az ion-intenzitás arányának reprodukálhatósága 4,3 %- ot ért el – ugyanabban a tripszinnel emésztett AGP mintában. Az ionok intenzitásának arányai a különböző AGP mintákban 17,5 % szórást mutattak.

IV. 1. 3. Az egészséges egyének és daganatos betegek adatai

Az egészséges egyénekben a korábbi irodalmi adatok alapján az ORM1 aránya 67,3 % ± 8,5 %, kutatásaink alapján az ORM1 variánsok százalékos előfordulása 76,3 % ± 8,2 % (11. táblázat). Az irodalmi adatok alapján az ORM1 variánsok mennyisége a humán plazmában meghaladja az ORM2 variáns mennyiségét (17-18). A mért adatok valóban azt jelzik, hogy az ORM1 variánsok nagyobb mennyiségben vannak jelen, az ORM2 variánshoz képest. Az ORM1 és ORM2 százalékos megoszlása az egészséges, valamint a rákos betegségben szenvedő csoportok esetében a táblázatban látható. A táblázat az ORM1/ORM2 arányát és a plazmában mért AGP szinteket is tartalmazza.

11. táblázat: Az ORM1 és ORM2 aránya a vizsgált csoportokban (A táblázatban a Mintaszám oszlopot kivéve átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórásadatok szerepelnek.)

	Mintaszám	ORM1 arány (%)	ORM2 arány(%)	ORM1/ORM2
Egészséges, kontroll csoport	**16**	**76,3 ± 8,2**	**23,7 ± 8,2**	**4,0 ± 2,4**
Limfómás csoport	**15**	**88,7 ± 6,2**	**11,3 ± 6,2**	**10,2 ± 4,8**
Ováriumtumoros csoport	**15**	**88,6 ± 9,6**	**11,4 ± 9,6**	**14,4 ± 8,6**
Melanómás csoport	**13**	**88,8 ± 4,4**	**11,2 ± 4,4**	**9,8 ± 6,1**
Rákos csoportok átlaga	**43**	**88,7 ± 6,8**	**11,3 ± 6,8**	**11,5 ± 6,5**

12. táblázat: Az AGP plazmaszintje és a genetikai variánsok koncentrációja a vizsgált csoportokban (A táblázatban átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórásadatok szerepelnek.)

	AGP (g/L)	ORM1 (g/L)	ORM2 (g/L)
Egészséges, kontroll csoport	**0,5 ± 0,2**	**0,4 ± 0,1**	**0,1 ± 0,1**
Limfómás csoport	**2,0 ± 0,7**	**1,8 ± 0,7**	**0,2 ± 0,1**
Ováriumtumoros csoport	**2,1 ± 0,7**	**1,8 ± 0,6**	**0,2 ± 0,2**
Melanómás csoport	**2,0 ± 0,5**	**1,8 ± 0,5**	**0,2 ± 0,1**
Rákos csoportok átlaga	**2,0 ± 0,6**	**1,8± 0,6**	**0,2 ± 0,2**

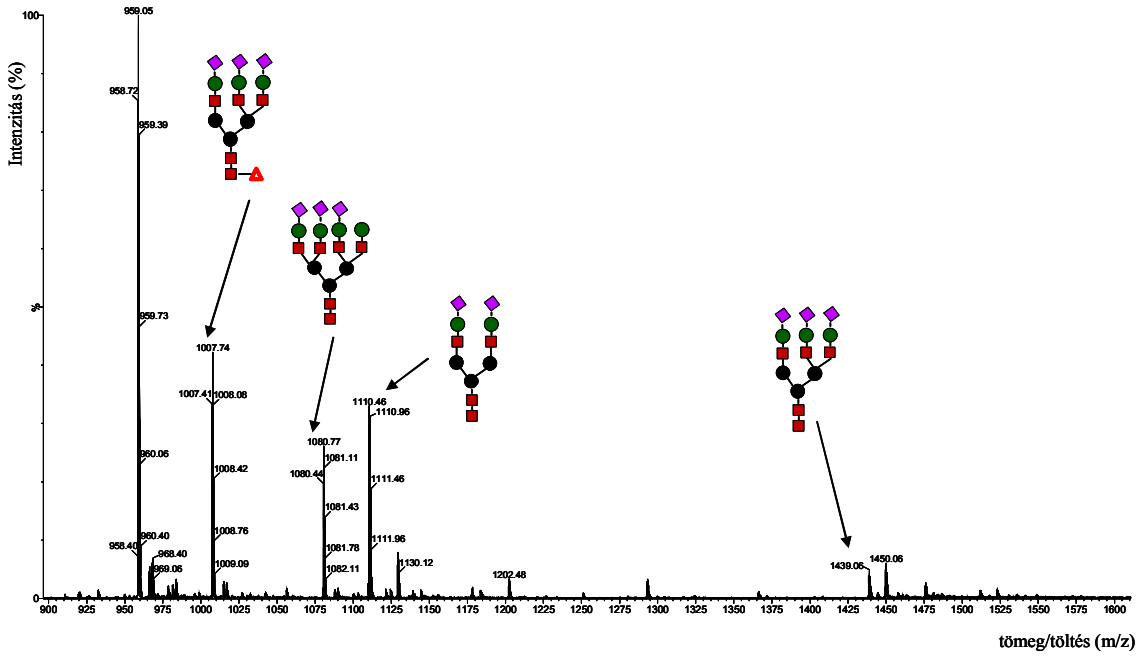
Az egészséges, kontroll csoporthoz viszonyítva az ORM1 százalékos aránya mindhárom rákos betegcsoportban emelkedett volt: limfómás betegek esetében 88,7 % ± 6,2 %, ovárium tumoros betegek csoportjában 88,6 % ± 9,6 %, a melanómás betegek körében 88,8 % ± 4,4 %-nak adódott az ORM1 aránya (11. táblázat). A rákos betegcsoportok értékei hasonlóak egymáshoz, mind a plazmában mért AGP szintjét illetően, mind az ORM1 és ORM2 variánsok százalékos előfordulását tekintve. Rákos betegek esetében megnő a plazmában mért AGP szint a négyszeresére, és változás tapasztalható a variánsok százalékos megoszlásában is. A 12. táblázatban látható, hogy amíg az ORM1 variánsok mennyisége 4,5-szeresére emelkedik, addig az ORM2 variáns mennyisége kétszeresére nő.

IV. 2. Oligoszacharidok analízisének eredményei

Kutatásaim második irányvonalát az oligoszacharidok analízise jelentette. Az AGP-ről lehasított N-glikánok képezték a mintául szolgáló oligoszacharidokat a HPLC-MS módszerfejlesztések során. Az optimális emésztési, tisztítási és detektálási paraméterek alkalmazásával kapott eredményeket ismertetem az alábbi fejezetben. Az oligoszacharidok izomereinek analíziséhez folyadékkromatográfiával kapcsolt technikákat alkalmaztam, melynek eredményei ebben a fejezetben olvashatók.

IV. 2. 1. Tömegspektrometriás analízis, kapcsolt technikák nélkül

Az AGP mintáról PNGáz F enzimmel lehasított és grafittöltetű SPE oszlopokon tisztított oligoszacharidok detektálása Q-Tof Premier tömegspektrométerrel történt. Az oligoszacharidok detektálására a negatív ionizációs technika kedvezőbb érzékenységet biztosított, mint a pozitív ionizáció. A bemutatott spektrumok negatív ionizációval, direkt injektálással készültek. Elektrospray ionforrás alkalmazása mellett az oligoszacharidok többszörös töltésű ionokként (2-3x) detektálhatók a spektrumban (10. ábra). Az oligoszacharidok között detektálhatók különböző antennaszámú és különböző mértékben szializált, ill. fukozilált oligoszacharidok. Az AGP emésztményéből 18 különböző oligoszacharidot sikerült detektálni, amelyek különböznek a monoszacharid összetételükben, így megkülönböztetésük tömegük alapján történt. Az oligoszacharidok elnevezése, töltése, m/z értéke és monoizotópos tömege a 13. táblázatban látható. Egyes oligoszacharidok nemcsak különböző töltésállapotban, hanem nátrium vagy kálium addukttal detektálhatók.



10. ábra: Az oligoszacharidok spektruma (a spektrumon balról jobbra haladva a TriS3F1, TetraS3, BiS2 és TriS3 csúcsai láthatók)

13. táblázat: A detektált oligoszacharidok

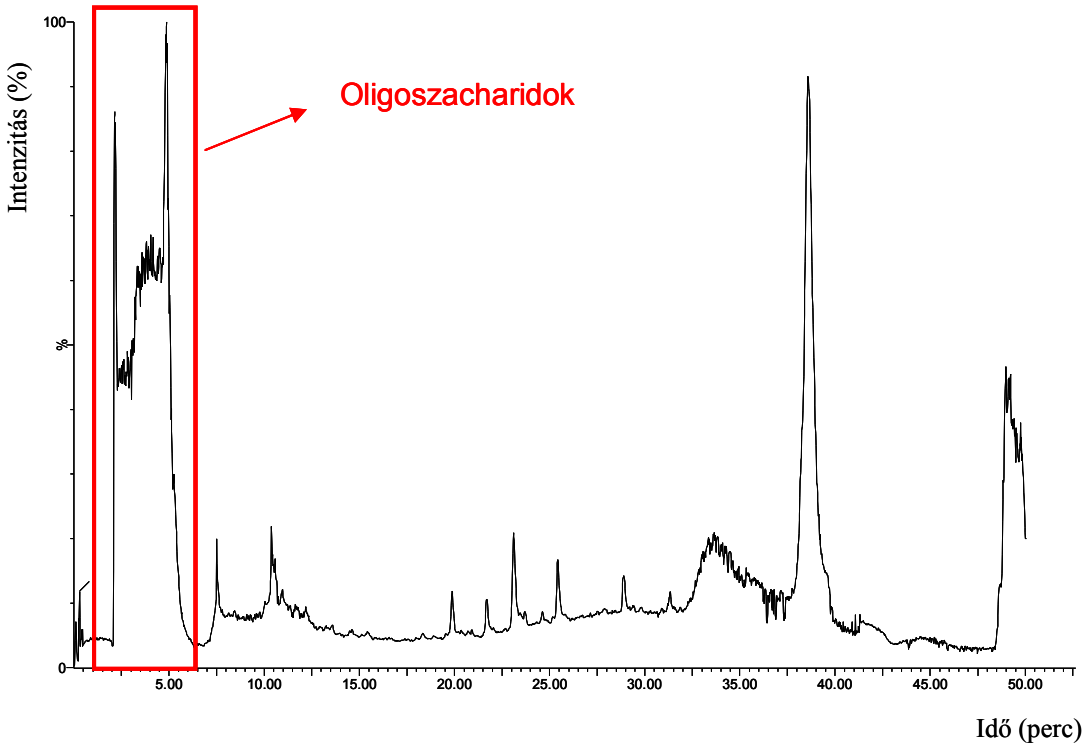
Sorszám	Név	Töltés	m/z érték	Monoizotópos tömeg
1	BiS2	2x	1110,3837	2222,783
	BiS2+Na	2x	1121,3747	
2	BiS2F1	2x	1183,4126	2368,8408
3	TriS2	2x	1292,9498	2587,9151
4	TriS2F1	2x	1365,9787	2733,973
	TriS2F1	3x	910,3165	
5	TriS3	2x	1438,4975	2879,0105
	TriS3	3x	958,6624	
	TriS3+Na	2x	1449,4884	
	TriS3+K	2x	1457,5426	
6	TriS3F1	2x	1511,5264	3025,0684
	TriS3F1	3x	1007,3483	
	TriS3F1+Na	2x	1522,5174	

	TriS3+K	2x	1457,5426	
7	TriS3F2	2x	1584,5554	3171,1263
	TriS3F2	3x	1056,0343	
8	TetraS2	2x	1475,5159	2953,0473
	TetraS2	3x	983,3413	
	TetraS2+K	2x	1494,5610	
9	TetraS2F1	2x	1548,5448	3099,1052
	TetraS2F1	3x	1032,0273	
10	TetraS3	2x	1621,0636	3244,1427
	TetraS3	3x	1080,3731	
	TetraS3+Na	2x	1632,0545	
	TetraS3+K	2x	1640,1087	
11	TetraS3F1	2x	1694,0925	3390,2006
	TetraS3F1	3x	1129,0591	
12	TetraS4	2x	1766,6113	3535,2381
	TetraS4	3x	1177,4049	
	TetraS4+Na	2x	1777,6022	
	TetraS4+Na	3x	1184,7322	
13	TetraS4F1	2x	1839,6402	3681,296
	TetraS4F1	3x	1226,0909	
	TetraS4F1+Na	3x	1233,4182	
14	TetraS4F2	3x	1274,7768	3827,3539
15	PentaS3	2x	1803,6297	3609,2749
	PentaS3	3x	1202,0838	
16	PentaS4	3x	1299,1157	3900,3704
17	PentaS4F1	3x	1347,8016	4046,4282
18	HexaS3	3x	1323,7946	3974,4071

IV. 2. 2. Fordított fázisú HPLC-MS módszer az oligoszacharidok analízisére

Az AGP-ről lehasított és tisztított oligoszacharidok folyadékkromatográfiás analízise fordított fázisú oszlopon és grafitoszlopon valósult meg.

Fordított fázisú oszlopon az oligoszacharidok retenciós ideje kicsi. Elválasztásról nem beszélhetünk, mert az összes oligoszacharid 2-5 perc között eluálódik a C18-as oszlopról (11. ábra). Ahhoz, hogy az oligoszacharidok retenciója növekedjen, fordított fázisú oszlopon derivatizálás szükséges. Derivatizálatlan oligoszacharidok esetében a gradiens változtatásával sem sikerült hosszabb retenciót vagy elválasztást elérni.



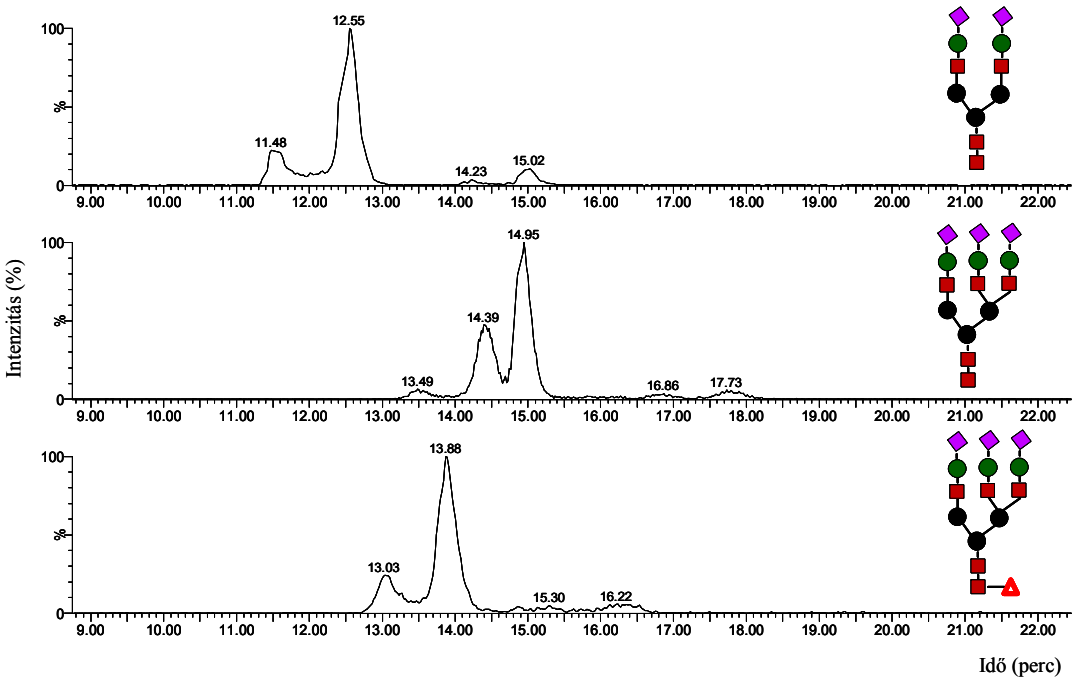
11. ábra: Az oligoszacharidok elúciója a fordított fázisú oszlopon

IV. 2. 3. Oligoszacharidok analízise grafitoszloppal kapcsolt tömegspektrometriával

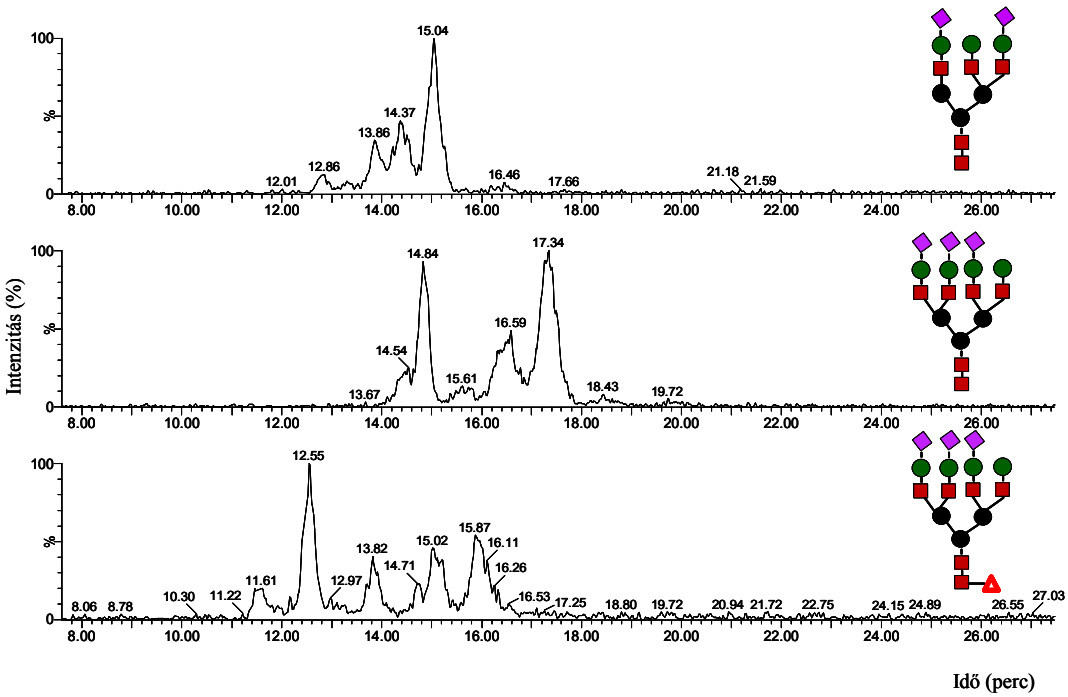
A grafitoszlop lehetővé teszi az oligoszacharidok és azok izomerjeinek elválasztását derivatizálatlan minták esetében is. Az AGP emésztmény detektálása a direkt injektálás esetén leírt optimális paraméterek mellett, negatív ionizációs technikával történt PGC-MS mérés esetén is. A 18 különböző monoszacharid összetételű oligoszacharid nyomon követhető a folyadékkromatográfiával kapcsolt MS-detektálás során. Az oligoszacharidok ion kromatogramjain 3-5 izomercsúcs elválása figyelhető meg (12. és 13. ábra). Az oligoszacharidok kromatográfiás analízise során a holtidő 1,7 percnél van.

Három oligoszacharid (BiS2, TriS2, TriS3F1) összesen 7 izomer ion kromatogramjának adataiból számítottam a relatív intenzitást. A folyadékkromatográfiás mérés spektrumában a legintenzívebb oligoszacharid a 2x negatív töltésű TriS3, amit báziscsúcsként alkalmaztam a relatív intenzitások meghatározása során. A relatív intenzitások szórása az adott izomerek ion kromatogramjainak intenzitásával számolva 0,6 %. A retenciós idő szórása a három oligoszacharid retenciós idejéből számítva 0,1 %-nak adódott.

Oligoszacharidok ion kromatogramjai grafitoszlopon



12. ábra: Oligoszacharidok ion kromatogramjai (BiS2, TriS3, TriS3F1)

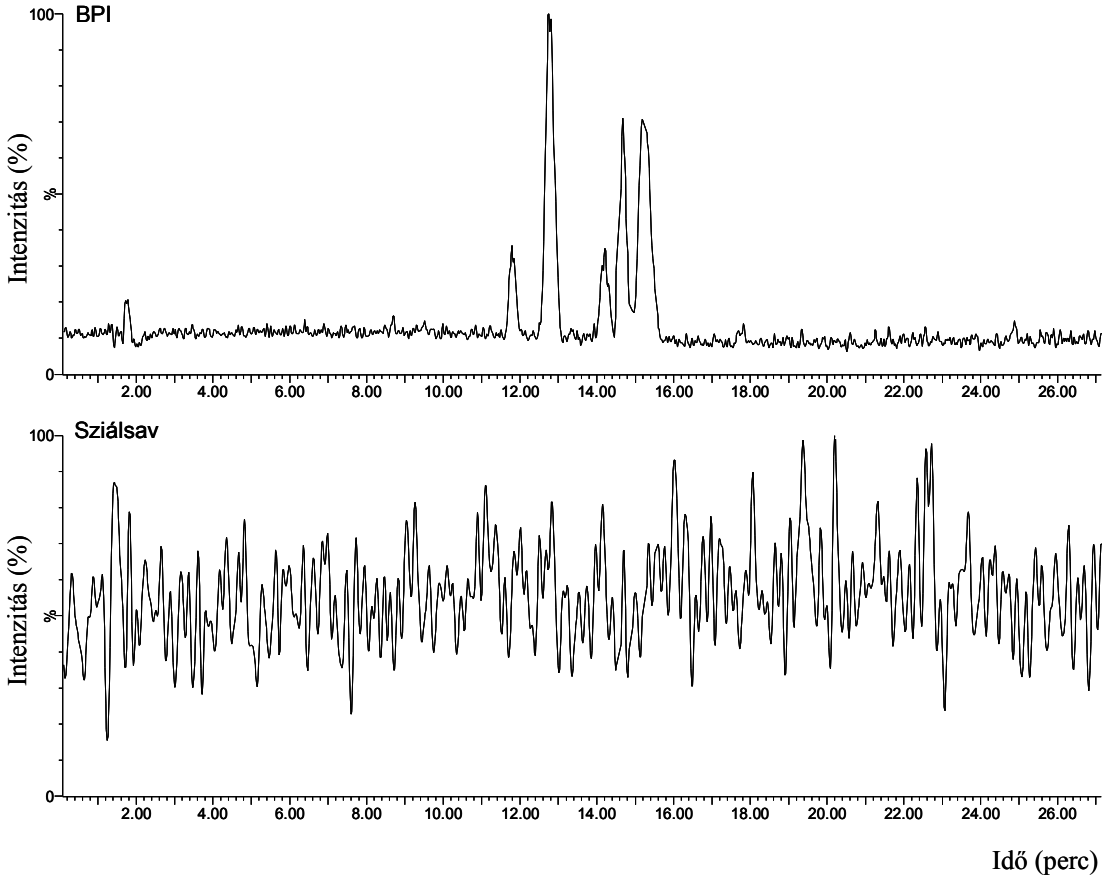


13. ábra: Oligoszacharidok ion kromatogramjai (TriS2, TetraS3, TetraS3F1)

Az ion kromatogramok összehasonlítása esetében látható, hogy különböző oligoszacharidok (TriS2, TetraS3, TetraS3F1) izomerei egy időben eluálódnak a

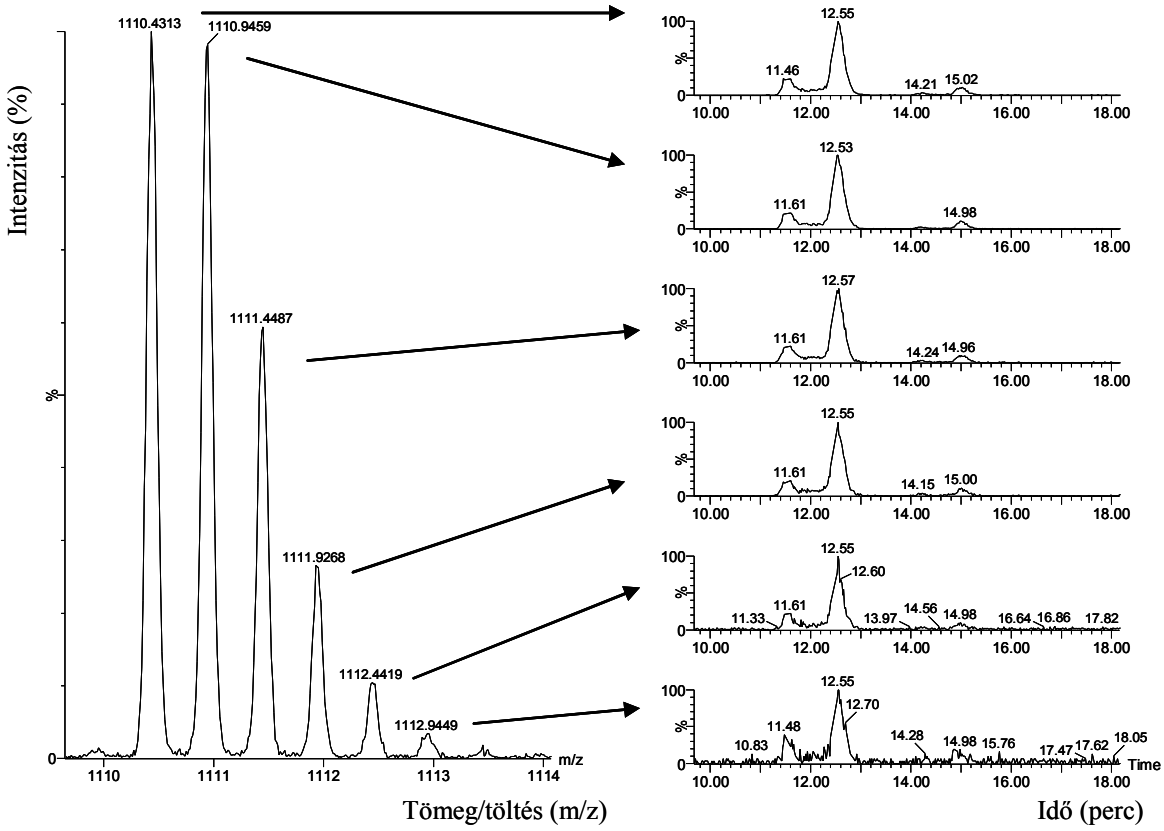
grafitoszlopról. Mindhárom oligoszacharid esetében (TriS2, TetraS3 és TetraS3F1) eluálódik a 15. perc körül egy izomercsúcs (13. ábra). Ahhoz, hogy eldöntsük, hogy egy oligoszacharid ion kromatogramján megjelenő összes izomercsúcs ugyanahhoz a molekulatömegű oligoszacharidhoz tartozik - és nem más oligoszacharid fragmense - a lehetséges fragmens ion kromatogramját is meg kell vizsgálni. Az oligoszacharidok fragmentációja során az első lehasadó fragmens a terminális sziálsav, ami negatív ionizációs módban a spektrumon 1x töltésű, és 290,1-es m/z értéknél jelenik meg.

A kromatográfiás analízis báziscsúcs kromatogramját (BPI) és a sziálsav ionkromatogramját összehasonlítva látható, hogy az oligoszacharidok elúciója során (10-20 perc között) a sziálsav fragmensének intenzitása nem emelkedik meg (14. ábra). A sziálsav ion kromatogramján nem látható intenzitás-emelkedés, ami a kromatográfiás mérés során bekövetkező fragmentációra utalna. A mérés során az ütközési energia 3,0 eV, ami nem idézi elő a sziálsav lehasadását. Az oligoszacharidok ion kromatogramjain látható izomercsúcsok így nem fragmensek izomercsúcsai, hanem az AGP emésztményben lévő oligoszacharidok izomerei.



14. ábra: A kromatográfiás analízis báziscsúcs kromatogramja (BPI) és a sziálsav ion kromatogramja grafitoszlopon

A spektrumon kiválasztva a BiS2 bármely izotópcsúcsát és arról ion kromatogramot készítve azt láthatjuk, hogy a különböző izotópcsúcsok ion kromatogramjai megegyeznek (15. ábra). Az izotópcsúcsok hasonló ion kromatogramjai a 15. ábrán valószínűleg egy oligoszacharid-szerkezethez tartoznak, a BiS2-höz.



15. ábra: A BiS2 izotópcsúcsai és ion kromatogramjai grafitoszlopos analízis során

A 14. táblázat az oligoszacharidok izomereinek (konstítúciós és sztereoizomer) számát jelöli. Egyes oligoszacharidok esetében kettő, más oligoszacharid esetén akár hat izomercsúcs- illetve izomercsúcs-köteg elválása figyelhető meg az ion kromatogramokon.

14. táblázat: Az oligoszacharidok izomereinek száma

Sorszám	Oligoszacharid	Izomerek száma
1	BiS2	4
2	BiS2F1	4
3	TriS2	5
4	TriS2F1	2
5	TriS3	5
6	TriS3F1	4
7	TriS3F2	2
8	TetraS2	2
9	TetraS2F1	2
10	TetraS3	5
11	TetraS3F1	5
12	TetraS4	6
13	TetraS4F1	4
14	TetraS4F2	2
15	PentaS3	2
16	PentaS4	2
17	PentaS4F1	2
18	HexaS3	4

IV. 2. 4. Az oligoszacharidok fragmentációja

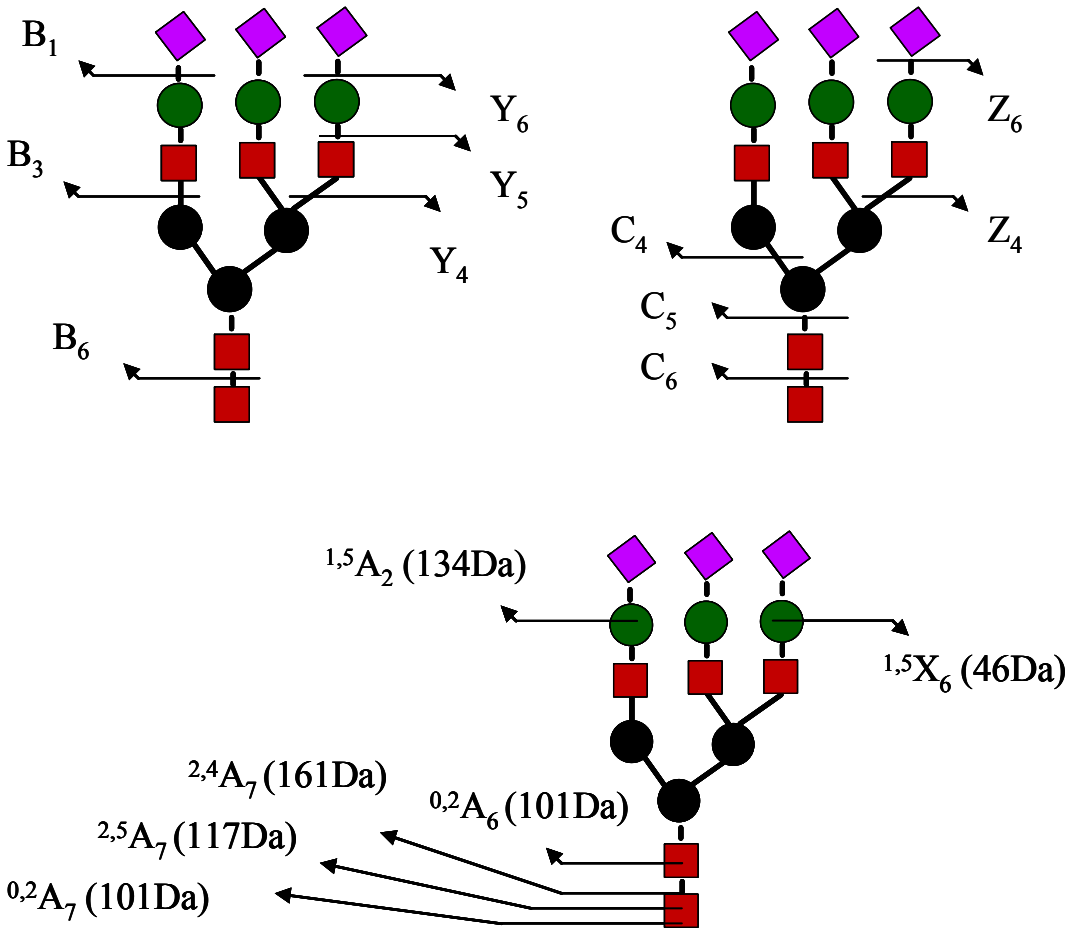
Az oligoszacharidok fragmentációja során a monoszacharid egységek leválása figyelhető meg és a monoszacharidok gyűrűjének felhasadása. A glikozidos kötés felhasadásából származó fragmensek Domon és Costello jelölése alapján A_i, B_i és C_i-vel jelzettek nem redukáló fragmensek esetében, illetve X_j, Y_j és Z_j-vel redukáló fragmenseknél (83).

Direkt injektálás során a BiS2 különböző ütközési energiával történő fragmentációját vizsgáltuk. Az elsőként lehasadó fragmens az ütközési energia növelése során a terminális sziálsav. A sziálsav hasadását a 101 Da-t elvesztő fragmens követi. Az ütközési energia növelésével a fragmensek száma nő, intenzitásuk növekszik, a spektrumokon nemcsak a glikozidos kötés felhasadásából származó fragmensek vannak

jelen (B_i,Y_j és C_i,Z_j fragmensek), hanem a monoszacharidok gyűrűjének felhasadása is bekövetkezik (A_i és X_j fragmensek).

Az AGP emésztmény fragmentációja során alkalmazott ütközési energia az oligoszacharidok jellemzésére 35-50 eV közötti nagyságú. PGC-MS mérések esetében egy adott molekulatömegű oligoszacharid különböző izoformjainak fragmentációja azonos ütközési energia alkalmazásával történt.

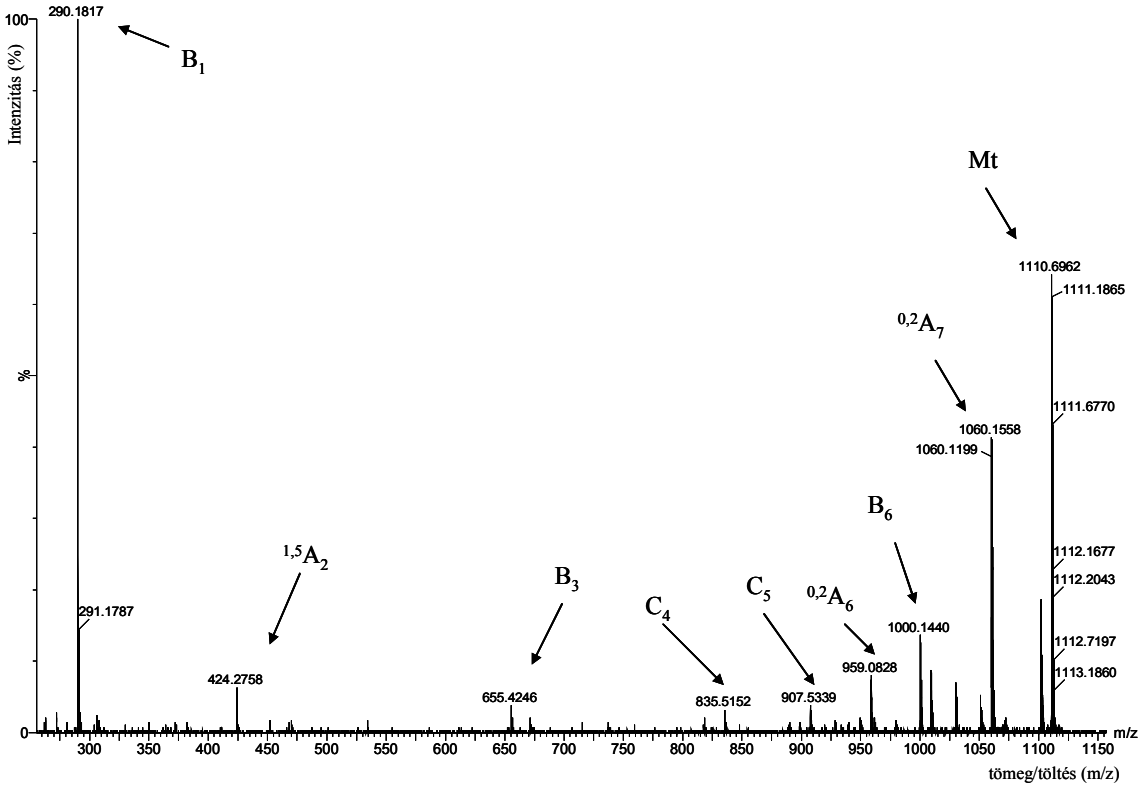
A grafitoszlopon elváló oligoszacharidok közül a két legnagyobb arányban jelenlévő BiS2 és TriS3 oligoszacharidokról sikerült értékelhető intenzitású tandem MS spektrumokat készíteni. A BiS2 és TriS3 detektált fragmensei láthatók az 16. ábrán a TriS3 szerkezetén ábrázolva.



16. ábra: Az oligoszacharidok fragmentációja

(A monoszacharidok fragmenseit (A és X fragmensek) bemutató ábrán a fragmens elnevezése mögött szereplő tömegegység a lehasadó fragmens tömegét jelöli. ■: N-acetil-glükózamin (GlcNAc), ●: mannóz (Man), ●: galaktóz (Gal), ◆: sziálsav (Sia), ▲: fukóz (Fuc))

A 17. ábrán a BiS2, a 18. ábrán a TriS3 összes fragmense látható. A spektrumok különböző ütközési energián felvett mérések összegzett spektrumai. Így a 3 eV-50 eV ütközési energia tartományra jellemző fragmensek mindegyike látható a spektrumon.

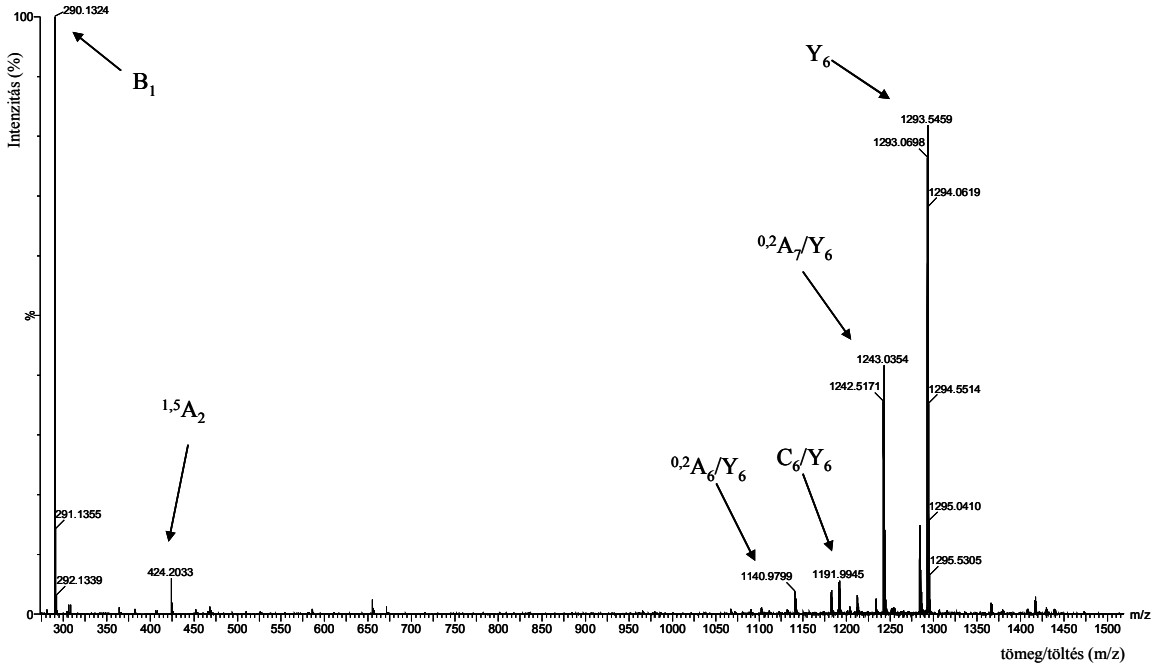


17. ábra: A BiS2 összes fragmense (negatív ionizáció, ütközési energia: 3-50 eV)

15. táblázat: A BiS2 fragmensei és jelölésük (GlcNAc: N-acetil-glükózamin, Hex: hexóz, Mt: molekulatömeg, Sia. sziálsav)

A fragmentáció leírása	Fragmens jelölése	Töltésállapot	m/z érték
Mt - 101 Da	$^{0,2}A_7$	2x	1059,89
Mt - GlcNAc - H_2O	B_6	2x	999,85
Mt - GlcNAc - 101 Da	$^{0,2}A_6$	2x	958,35
Mt - Sia	Y_6	1x	1930,69
Mt - Sia - H_2O	Z_6	1x	1912,68
Mt - Sia - 101 Da	$^{0,2}A_7/Y_6$	1x	1829,69
Sia	B_1	1x	290,10
Sia + Hex + GlcNAc	B_3	1x	655,22
Sia +134 Da	$^{1,5}A_2$	1x	424,09
Sia + Hex + GlcNAc + Hex + H_2O	C_4	1x	835,28
Mt - 117 Da	$^{2,5}A_7$	2x	1051,89
Mt - 161 Da	$^{2,4}A_7$	2x	1029,89
Mt - GlcNAc	C_6	2x	1008,85
Mt - 2 GlcNAc	C_5	2x	907,31

A 15. és 16. táblázat tartalmazza a BiS2 és TriS3 esetében a molekulaionról lehasadó monoszacharidok megnevezését és a monoszacharid fragmenseket. A monoszacharidok fragmensei esetében a lehasadó fragmensnek megfelelő tömeg jelölése szerepel. Az Mt rövidítés a molekulatömeget jelenti.



18. ábra: A TriS3 összes fragmense (negatív ionizáció, ütközési energia: 3-50 eV)

16. táblázat: A TriS3 fragmensei és jelölésük (GlcNAc: N-acetil-glükózamin, Hex: hexóz, Mt: molekulatömeg, Sia. sziálsav)

A fragmentáció leírása	Fragmens jelölése	Töltésállapot	m/z érték
Sia	B_1	1x	290,10
Sia + 134 Da	$^{1,5}A_2$	1x	424,09
Sia + Hex + GlcNAc	B_3	1x	655,22
Mt - Sia	Y_6	2x	1292,96
Mt - Sia - H_2O	Z_6	2x	1283,95
Mt - Sia -101 Da	$^{0,2}A_7/Y_6$	2x	1242,46
Mt - Sia - 101 - H_2O	$^{0,2}A_7/Z_6$	2x	1233,45
Mt - Sia - Hex	Y_5	2x	1211,96
Mt - Sia -161 Da - H_2O	$^{2,4}A_7/Z_6$	2x	1203,45
Mt - Sia - GlcNAc	C_6/Y_6	2x	1191,42
Mt - Sia - GlcNAc - H_2O	B_6/Y_6	2x	1182,46
Mt - Sia - GlcNAc - 101	$^{0,2}A_6/Y_6$	2x	1140,92
Mt - Sia - GlcNAc -101 - H_2O	$^{0,2}A_6/Z_6$	2x	1131,91
Mt - Sia - Hex - GlcNAc	Y_4	2x	633,47
Mt - Sia - Hex - GlcNAc - H_2O	Z_4	2x	1101,41
Mt - Sia - 2 GlcNAc	C_5/Y_6	2x	1090,01
Mt - Sia - 2 GlcNAc - 46 Da	$C_5/^{1,5}X_6$	2x	1066,88
Mt - 2 Sia	Y_6/Y'_6	1x	2295,82
Mt - 2 Sia - 101 Da	$^{0,2}A_7/Y_6/Y'_6$	1x	2194,82

IV. 2. 4. 1. Grafitoszlopon elváló izoformok tandem MS analízise

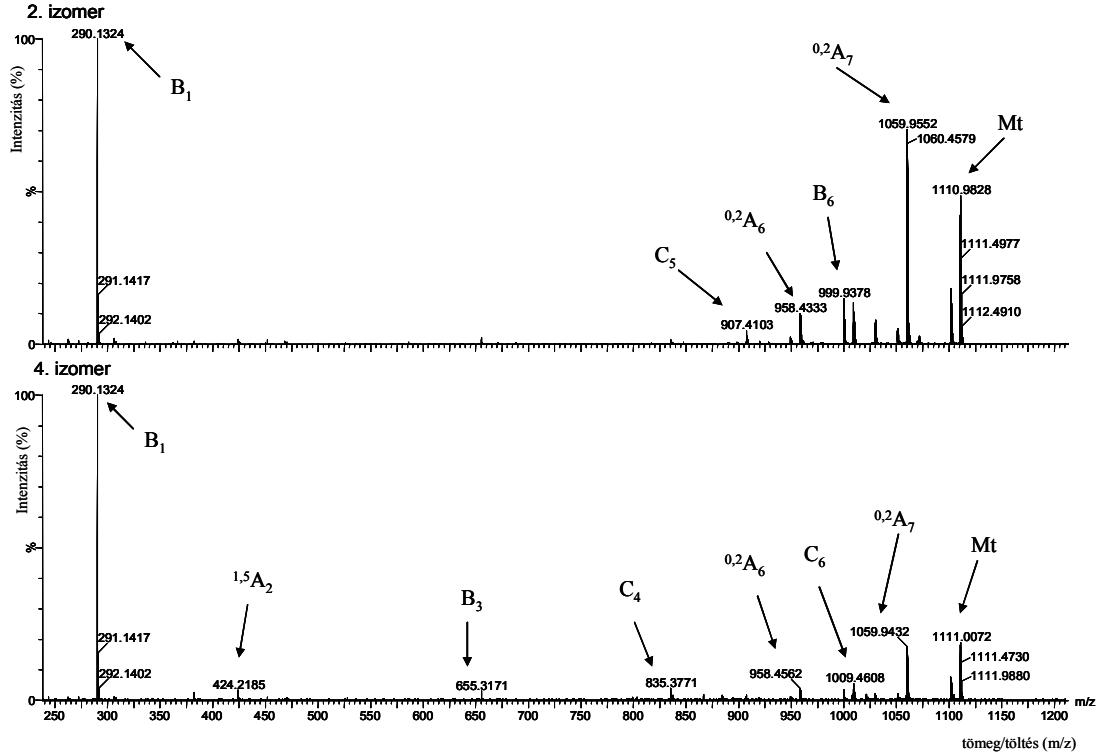
Az oligoszacharidok izoformjai közötti eltérés szerkezetbeli oka a monoszacharidok eltérő sorrendű kapcsolódására, valamint a monoszacharidok közötti

eltérő kötéstípusból adódhat. Az eltérő kapcsolódás a fukózt tartalmazó oligoszacharidok esetében lehetséges. Fukózt tartalmazó oligoszacharid PGC-MS analízise esetében az izoformok tandem MS spektrumainak intenzitása alacsony, nem értékelhető. Fukózra jellemző fragmenst az izoformok tandem MS spektrumaiban sem és a direkt injektálás során végzett tandem MS méréseknél sem lehetett detektálni.

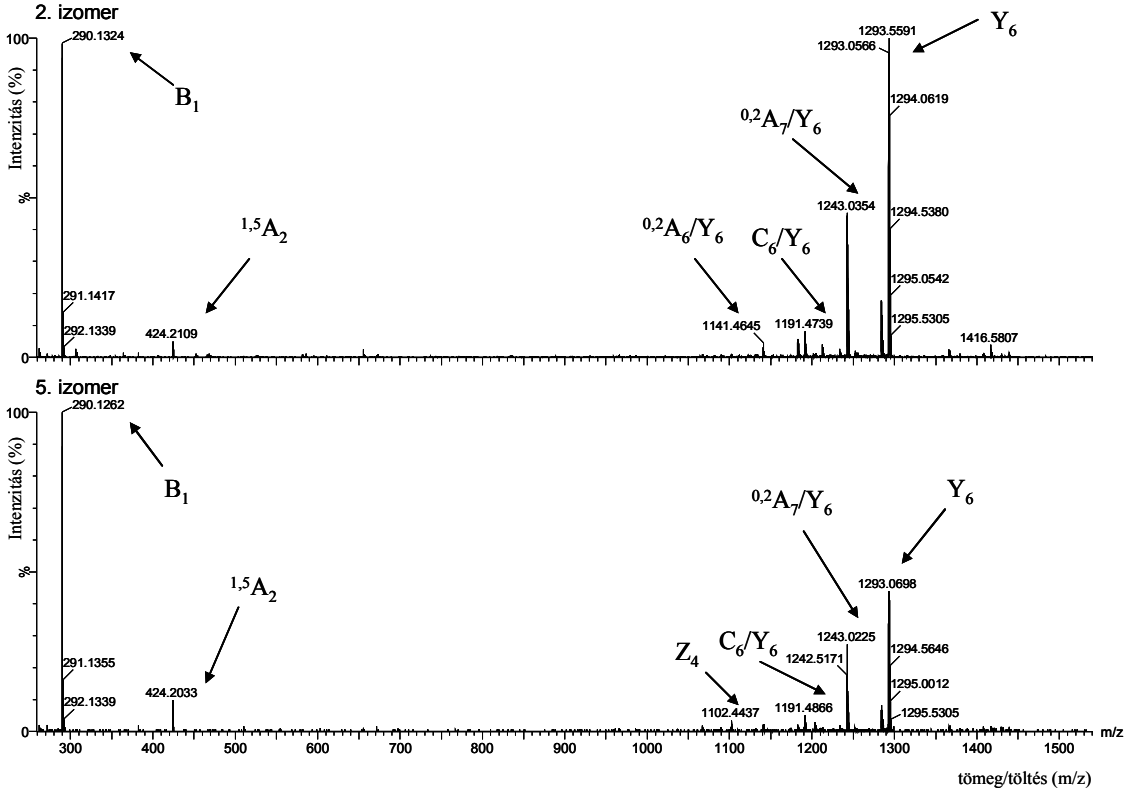
Értékelhető intenzitású tandem MS spektrumok készültek a két legnagyobb arányban előforduló oligoszacharidokról, a BiS2-ről és a TriS3-ról (19. és 20. ábra). A BiS2 és a TriS3 esetében a lehetséges izoformok a monoszacharidok közötti eltéső kötéstípusból adódhatnak. A terminális sziálsav α(2-3) és α(2-6) kötéssel is képes kapcsolódni a galaktózhoz. Többféle kötéstípus jöhet létre az antennák elágazásánál, a mannóz és az N-acetil-glükózamin között.

A lehasadó sziálsav negatív ionizációs módban a spektrumban 290,1-es m/z értéknél detektálható. Izoformok analízisekor ugyanazon ütközési energia alkalmazása mellett a sziálsav fragmensének eltérő lehet a molekulaionhoz viszonyított intenzitása, ami a sziálsav és galaktóz közötti eltérő kötéstípussal indokolható.

A mannóz és az N-acetil-glükózamin közötti kötés felhasadásából származó fragmens a 655,0 m/z értéknél jelenik meg a spektrumokon. A fragmens különböző izoformokban detektált különböző molekulaionhoz viszonyított intenzitása szintén az eltérő kötéstípusokkal magyarázható.



19. ábra: A BiS2 izomereinek tandem MS spektrumai grafitoszlopos analízis során



20. ábra: A TriS3 izomereinek tandem MS spektrumai grafitoszlopos analízis során

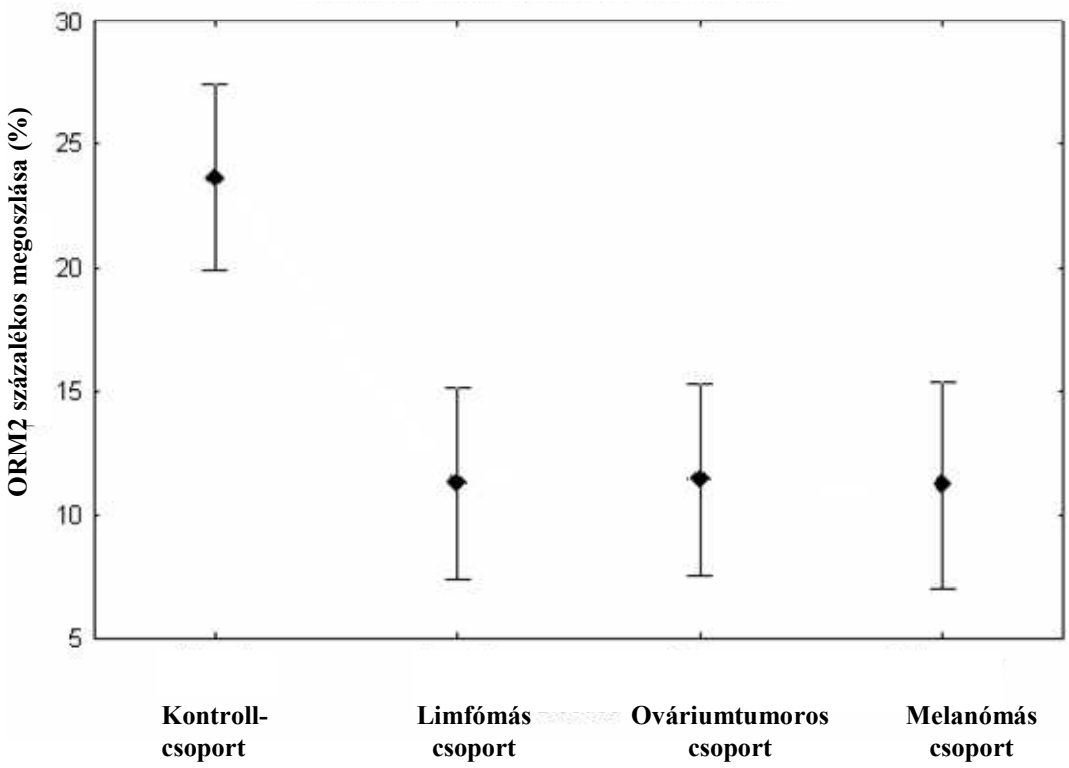
V. MEGBESZÉLÉS

V. 1. Az AGP genetikai variánsainak megoszlása

Kutatómunkám során az AGP genetikai variánsainak arányát vizsgáltam egészséges önkéntesek és daganatos betegségben szenvedő betegek esetében. A genetikai variánsok arányának meghatározását HPLC-MS módszer alkalmazásával végeztem. Egy peptidpár kiválasztásával az ORM1 és ORM2 genetikai variánsok megoszlása jellemezhető a vizsgált csoportokban. Az egészséges és betegcsoportokban a genetikai variánsok megoszlásának összehasonlítását végeztem el. Az eredmények összevetése a vizsgált csoportokban és a kutatómunkám során kapott eredmények irodalmi értékekkel történő összehasonítása az alábbi fejezetben olvasható.

V. 1. 1. A genetikai variánsok megoszlása az egészséges egyénekben és daganatos betegek esetében

Méréseink eredményei az ORM1 és ORM2 százalékos megoszlásáról nyújtanak információt, valamint az ORM1/ORM2 arányról. Az adatok további értékelését statisztikai módszerek segítik. Az ORM2 variáns százalékos arányában tapasztalt eltérést az egészséges és a betegcsoportokban variancia-analízis segítségével értékeltük. A variancia-analízis számos, egyező szórású csoport átlagának összevetésére alkalmas statisztikai módszer. Adott vizsgálat során előálló teljes adatmennyiség, mint alaphalmaz esetében annak a tisztázását segíti, hogy a szórásbeli eltérések mögött a véletlen vagy egy másik magyarázó tényező hatása fedezhető-e fel. Ilyen tényezőnek tekinthető egy adott mintahalmazon belül a csoportok átlagai közötti eltérés.

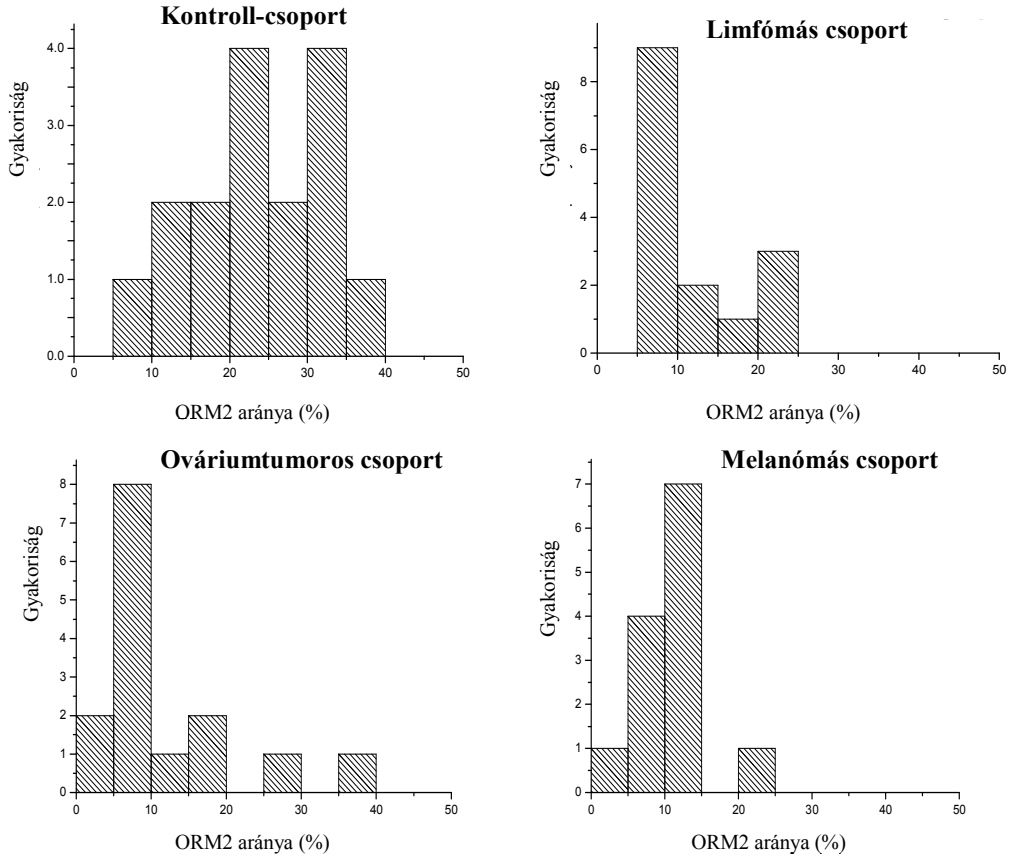


21. ábra: Az ORM2 százalékos megoszlása a kontoll-csoportban és a betegcsoportokban (Az ábrán az átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórásértékek szerepelnek.)

A 21. ábrán a variancia-analízis eredménye látható. A variancia-analízis az F próbán alapszik, ami az értékelés során 19,682 volt; a konfidencia intervallum 95 %. A variancia-analízis eredményeként megállapítható, hogy egy, a kontroll csoport értékei statisztikailag eltérnek a többi, rákos betegcsoport értékeitől. Az eredményekből látható, hogy szignifikáns különbség van az egészséges és a betegcsoportok ORM2 százalékos aránya között. Ugyanakkor a rákos betegcsoportok összehasonlítása esetében az derül ki, hogy nincs szignifikáns különbség a betegcsoportok ORM2 értékeit tekintve.

Az ORM2 százalékos értékei bizonyos értékkategória szintek között jelennek meg a 22. ábrán, a hisztogramon. A hisztogram a gyakoriság értékeket jeleníti meg a kontroll csoportban és a betegcsoportokban. A limfómás és ováriumtumoros betegcsoportban a leggyakoribb ORM2 százalékos megoszlás az 5-10 % közé eső kategóriában található. Melanómás betegek esetében 10-15 % közötti értékkategóriában

található a legtöbb beteg adata, a kontroll csoportban azonban az 5-15 % közötti ORM2 százalékos megoszlás nem jelenik meg karakterisztikusan.



22. ábra: Hisztogram az ORM2 arányáról a vizsgált csoportokban

Az ORM1/ORM2 arány alkalmas arra, hogy információt adjon a genetikai variánsok szintjének egymáshoz viszonyított emelkedéséről. Az egészséges, kontroll csoportban az ORM1/ORM2 értéke 4,0 ± 2,4. a betegcsoportokban az ORM1/ORM2 szint megváltozik az egészséges csoport értékéhez viszonyítva, ami azt jelzi, hogy a két genetikai lókuszhoz tartozó variánsok expressziója nem azonos mértékben növekszik meg. A limfómás csoportban az ORM1/ORM2 aránya 10,2 ± 4,8, az ovárium tumorosok esetében 14,4 ± 8,6, és a melanómások esetében 9,8 ± 6,1. Az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva a legnagyobb az eltérés a ORM1/ORM2 arányt tekintve az ováriumtumorosok csoportjában tapasztalható. Az ORM1/ORM2 arányok a rákos betegcsoportok esetében megemelkedett értékek, ami arra utal, hogy az ORM1

genetikai lókuszon kódolt genetikai variánsok expressziója fokozódik nagyobb mértékben a mért rákos megbetegedések esetében.

Az eredmények azt mutatják, hogy az egészséges és betegcsoportok között szignifikáns különbség mutatkozik a genetikai variánsok százalékos arányában, azonban a rákos betegcsoportok esetében a variánsok megoszlásában nem fedezhető fel szignifikáns különbség. Kutatásaink alapján a genetikai variánsok expressziója nem azonos mértékben fokozódik a rákos megbetegedésekben, hanem az ORM1 lókuszon kódolt genetikai variánsok fokozottabb expressziója figyelhető meg, az ORM2 lókuszon kódolt genetikai variánssal szemben. Mérési eredményeink megerősítik azt a korábbi feltételezést, hogy az AGP koncentrációjának emelkedése esetében az ORM1 lókuszú variánsok expressziója fokozottabb, mint az ORM2 lókuszú variánsé (16).

V. 1. 2. Az eredmények összevetése irodalmi adatokkal

Az eredményeket érdemes összevetni Duché értékeivel, bár a genetikai variánsok meghatározásához eltérő analitikai módszert alkalmazott, a kiválaszott mintaszám nagyobb volt (74 egészséges és 61 rákos beteg összehasonlítva kutatásunkkal, a 16 egészséges és 43 rákos beteg értékével). Duché kutatásaiban az egészséges populációra vonatkozóan hasonló eredményeket találunk (17). A plazmában mért AGP koncentrációja megegyezik a két kutatásban: 0,5 g/l. Az ORM1 variánsok aránya eltér (67% és 76%), de az eltérés a 9 %-os szóráson belül marad.
Az eredmények összevetése látható a 17. táblázatban.

17. táblázat: A genetikai variánsok megoszlása Duché kutatásai és saját kutatásaink alapján (A táblázatban átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórásadatok szerepelnek.)

	AGP (g/L)	ORM1 (%)	ORM2 (%)
Duché (17) kutatásai alapján Kontroll csoport	0,5 ± 0,14	67,3 ± 8,5	32,7 ± 8,5
Duché (17) kutatásai alapján Rákos csoportok átlaga	1,12 ± 0,51	67,8 ± 11,6	32,2 ± 11,6
Saját kutatási eredmények Kontroll csoport	0,5 ± 0,2	76,3 ± 8,2	23,7 ± 8,2
Saját kutatási eredmények Rákos csoportok átlaga	2,0 ± 0,6	88,7 ± 6,8	11,3 ± 6,8

Mindkét kutatás alapján (Duché és saját, bemutatott kutatás) a plazmában mért AGP koncentrációja emelkedik a rákos megbetegedések következtében. Duché tanulmányában kétszeres emelkedést tapasztalt, kutatásaink során négyszeres emelkedést figyeltünk meg (17,18). Az AGP koncentrációjának emelkedésében tapasztalt eltérés a különböző mintaválasztásnak is lehet az eredménye. Kutatásaink során a rákban szenvedő páciensek a rák előrehaladott stádiumában voltak a mintavétel

időpontjában. Duché tanulmányában nem található utalás a mintaválasztási kritériumokra, illetve a páciensek betegségének stádiumára vonatkozóan (18).

Különbség azonban Duché kutatásait és az általunk kapott eredményeket összevetve az, hogy Duché nem tapasztalta az ORM1 variánsok jelentősebb emelkedését az ORM2-höz viszonyítva rákos betegek esetében. Duché kutatásaiban a vizsgált rákos betegcsoportok a rákos megbetegedés alapján eltértek a kutatásainkban analizált mintáktól, azonban ováriumtumoros csoport mindkét kutatásban előfordult (18).

Eredményeink összhangban vannak azzal a korábbi megfigyeléssel, ami szerint az ORM1 genetikai variánsok nagyobb mértékben hozzájárulnak az akut fázis reakciók során az AGP koncentrációjának emelkedéséhez (16).

V. 2. Oligoszacharidok szerkezeti jellemzése

A kutatómunkám során kidolgozott HPLC-MS módszer glikoproteinekről lehasított N-glikánok analízisére alkalmas. Grafitoszlop segítségével az oligoszacharidok izomereinek elválasztása érhető el. A tömegspektrometria a molekulatömeg alapján történő pontos azonosítást teszi lehetővé. A módszer újszerűségét a grafitoszlopos elválasztás nyújtja, ami lehetővé teszi az oligoszacharidok izomereinek analízisét. Az AGP-ről lehasított N-glikánok megoszlását a vizsgált mintában, az oligoszacharidok grafitoszlopról történő elúciós sorrendjét, valamint az izoformok tandem MS analízisének megbeszélését az alábbi fejezetben ismertetem.

V. 2. 1. Folyadékkromatográfiás analízis

Az oligoszacharidok szerkezetbeli eltéréseinek jellemzésére a grafitoszloppal kapcsolt MS-analízis kedvezőbb meghatározási lehetőséget kínál, mint a fordított fázisú oszloppal kapcsolt MS-analízis. Az „Eredmények” fejezet IV.2.2. alfejezetében látható, hogy a fordított fázisú oszlopon az oligoszacharidok koelúciója lép fel, elválasztásuk nem válik lehetővé. Grafitoszlop alkalmazásával az AGP emésztményből 18 különböző monoszacharid-összetételű oligoszacharid elválasztása mellett, az oligoszacharidok egyes izomereinek elválasztása is lehetővé vált. A folyadékkromatográfiás analízis az oligoszacharidok késleltett retencióját eredményezi grafitoszlopon, míg a C18-as oszlopon az oligoszacharidok retenciós ideje rövid, izomerek elválasztása nem válik lehetővé.

V. 2. 2. Oligoszacharidok megoszlása az AGP emésztményben

Az ion kromatogramokon az izomercsúcsok integrálásával a mintában lévő oligoszacharidok megoszlása jellemezhető. A mérés során a detektált oligoszacharidok

érzékenysége eltérő lehet, így a mérés nem felel meg kvantitatív meghatározásnak, azonban az integrált csúcsterületek a megoszlásra vonatkozó becslést nyújtanak.

Egy oligoszacharid esetében az izomer csúcsainak integrálását a csúcsterületek összegzése követte. A 18 különböző monoszacharid-összetételű oligoszacharid AGP emésztményre jellemző megoszlási adatát a 18. táblázat foglalja össze. Az oligoszacharidok megoszlását jellemző táblázatban a százalékos megoszlási értékek átlagértékek, amik három reprodukált mérés adataiból származnak. A mérések integrálásából származó megoszlási adatok szórása 29,0 %, abban az esetben, ha öt oligoszacharid szórási értékét kivesszük a listából. Az öt, listába nem számító oligoszacharid, a kis megoszlási hányadossal jellemezhető TetraS4F2, PentaS3, PentaS4 és PentaS4F1, valamint a TetraS3F1. Magas szórásértékeket a 3-4 %-nál alacsonyabb megoszlással rendelkező oligoszacharidok esetében találunk.

18. táblázat: A PGC-MS mérés során detektált oligoszacharidok megoszlása

Sorszám	Név	100-ra normált összterület esetében az oligoszacharidok megoszlása %-ban	A szórás %-ban
1	BiS2	16,8	11,5
2	BiS2F1	1,3	37,0
3	TriS2	8,0	54,7
4	TriS2F1	3,6	18,0
5	TriS3	29,2	9,1
6	TriS3F1	10,1	4,2
7	TriS3F2	0,3	15,5
8	TetraS2	4,2	17,3
9	TetraS2F1	1,1	40,7
10	TetraS3	8,0	35,0
11	TetraS3F1	3,3	100,1
12	TetraS4	5,9	20,9
13	TetraS4F1	4,2	75,4
14	TetraS4F2	0,8	93,1
15	PentaS3	0,9	86,7
16	PentaS4	1,0	72,4
17	PentaS4F1	0,2	173,2
18	HexaS3	1,0	37,7

Az oligoszacharidok összes izomercsúcsának integrálásával és összegzésével kapott eredményekből következtethetünk az oligoszacharidok megoszlására az AGP emésztményben. Az oligoszacharidok közül a legnagyobb arányban - 29,2 %-ban - a TriS3 található meg az AGP oligoszacharidjai között. A BiS2 16,8 %-ban fordul elő a mintában. A fukozilált oligoszacharidok közül a legnagyobb arányban a TriS3F1 található meg. A négyantennás oligoszacharidok 8 % alatti arányban vannak jelen a mintában. Az ötantennás oligoszacharidokra pedig 1 %-os vagy annál kisebb megoszlási arány jellemző.

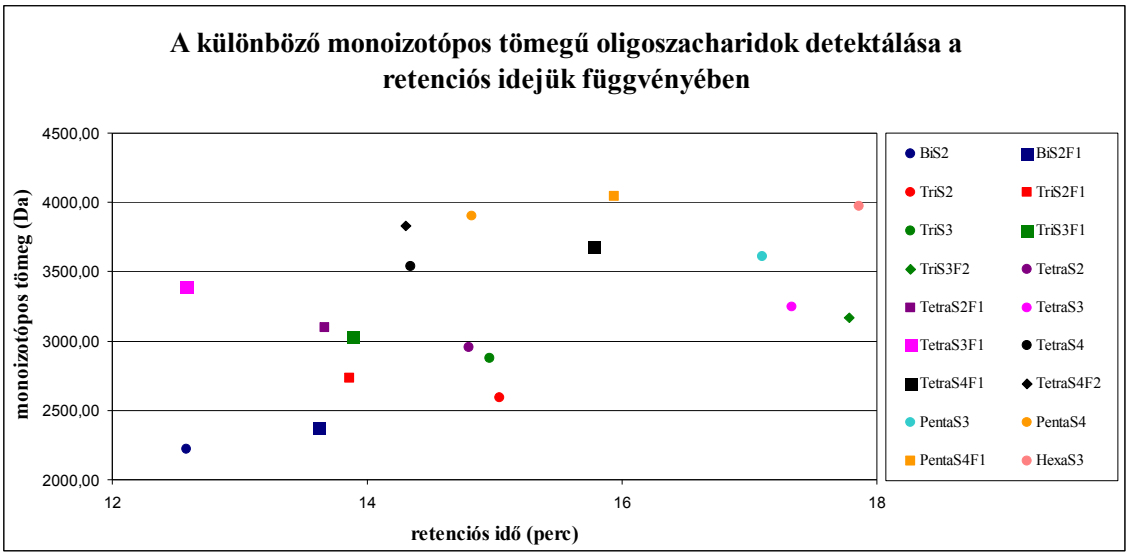
V. 2. 3. Oligoszacharidok retenciós ideje grafitoszlopon

Irodalmi adatok alapján az oligoszacharidok grafitoszlopról történő elúciós sorrendjét a molekulatömegükön kívül, a monoszacharid-elágazások száma, a fukóz jelenléte is befolyásolja. A molekulatömeg növekedésével az oligoszacharidok retenciós ideje is növekedni látszik, azonban csökkentik a retenciós időt a monoszacharid-elágazások (68-69, 77).

A retenciós idők vizsgálatát az nehezíti garfitoszlopos méréseknél, hogy a komplex oligoszacharidok több izomercsúcsra válnak szét. A bemutatott értékelésben a legintenzívebb izomercsúcs retenciós ideje szerepel. Eltérésre adhat okot a retenciós idők tekintetében az izomercsúcsok kiválasztása és eltérés mutatkozhat az izomercsúcsok arányaiban különböző glikoprotein emésztmények esetében. Figyelembe véve a kiválasztásból adódó eltérések mértékét, az elúciós időkre és az elúció sorrendjére vonatkozó következtetések csak becslések lehetnek.

Kutatásaink eredményeiből az tűnik ki, hogy a kisebb molekulatömegű oligoszacharidok kisebb retenciós idővel eluálódnak, mint a nagyobb tömegűek, azonban egyenes arányosság nem állítható fel a retenciós idő és a molekulatömeg között (23. ábra). Egy adott oligoszacharidot és a hozzá tartozó 1x fukozilált szerkezet elúciós idejét vizsgálva azt láthatjuk, hogy egyes oligoszacharid-pároknál a fukozilált izoform elúciója kisebb retenciós idővel következik be (Pl. TriS2-TriS2F1, TriS3-TriS3F1, TetraS2-TetraS2F1, TetraS3-TetraS3F1). Az alábbi oligoszacharid-párok fukozilált izoformja később eluálódik: BiS2-BiS2F1, TetraS4-TetraS4F1 és PentaS4-PentaS4F1

Az oligoszacharidok retenciós viselkedésére vonatkozó megfigyeléseink – figyelembe véve a módszer korlátait és hibáit – egyezést mutatnak az irodalomban leírt megfigyelésekkel. (68-69, 77).

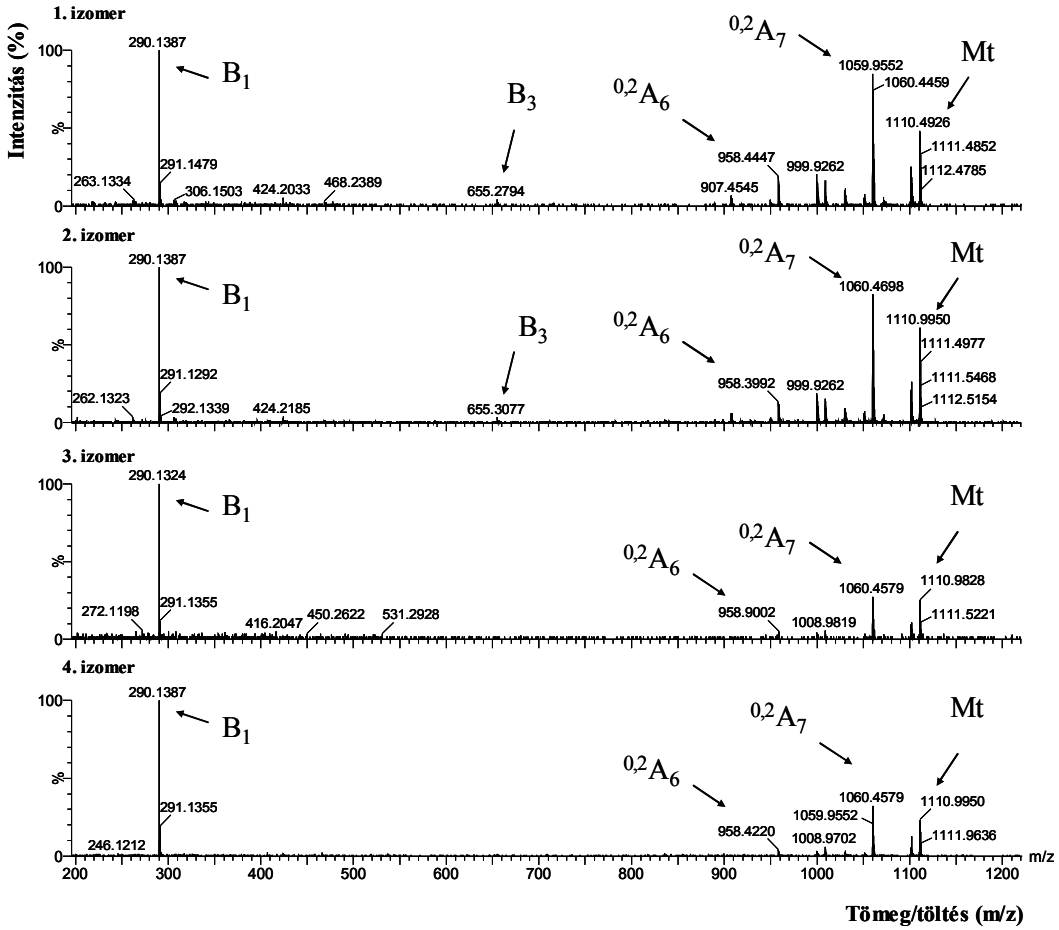


23. ábra: Oligoszacharidok elúciója grafitoszlopról

V. 2. 4. Oligoszacharidok izoformjainak tandem MS analízise

Egy adott molekulatömegű oligoszacharid különböző izoformjainak tandem MS-méréseit hasonlítottuk össze azért, hogy az egyes izoformok közötti szerkezeti különbségeket jobban jellemezhessük. Egy adott molekulatömegű oligoszacharid izoformjainak tandem MS-analízise során az alkalmazott ütközési energián nem változtattunk. A BiS2 oligoszacharid esetében 40 eV, a TriS3 esetében 50 eV ütközési energia fragmentálta az oligoszacharidokat.

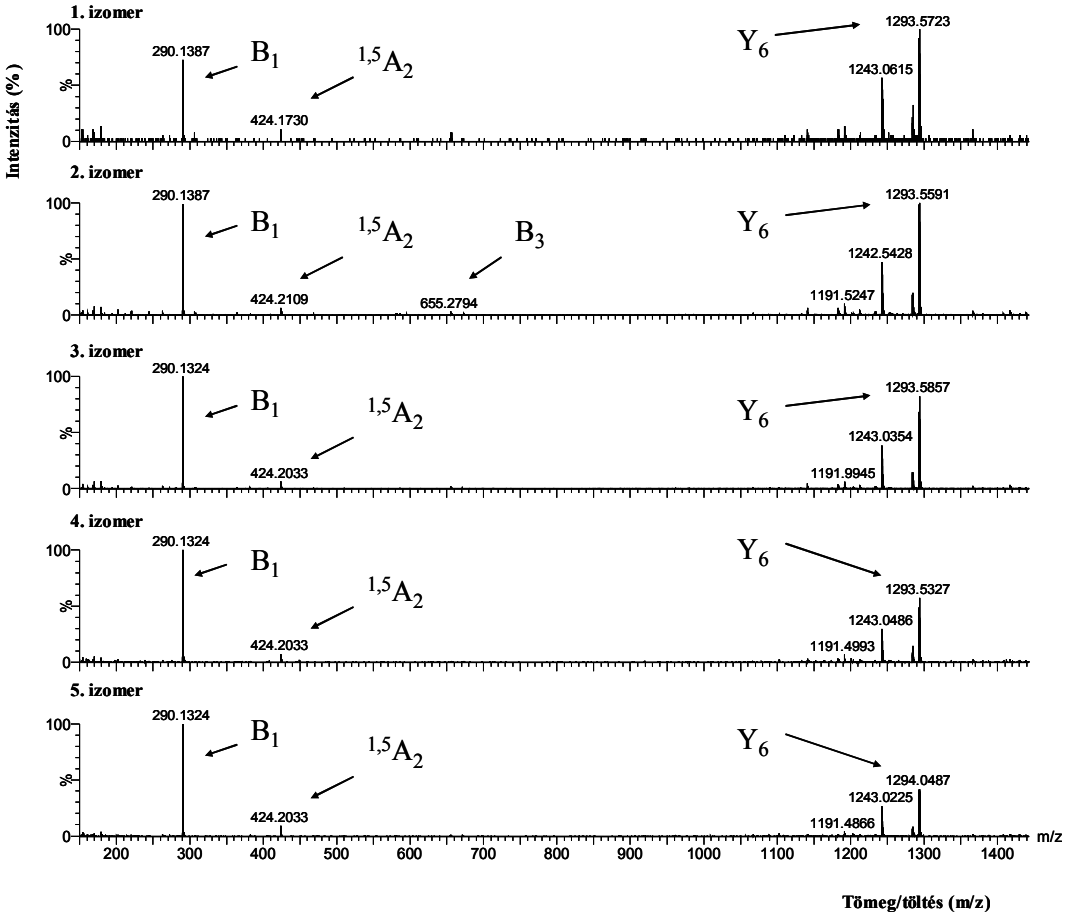
Az egyes fragmensek intenzitásának összehasonlításához a molekulaionhoz viszonyított intenzitásukat vettük alapul. A 24. és 25. ábrákon a BiS2 és a TriS3 négy, illetve öt izoformjának fragmentációs tulajdonságai láthatók.



24. ábra: A BiS2 izomereinek tandem MS spektrumai
(grafitoszlopos analízis, negatív ionizáció, ütközési energia: 40 eV)

A BiS2 oligoszacharid mind a 4 izomerének spektruma 40 eV ütközési energia alkalmazása mellett készült. A BiS2 összes izoformja esetében az tapasztalható, hogy a molekulaionhoz viszonyított legintenzívebb fragmens a 290-es m/z-jű, B_1 fragmens, azaz a lehasadó sziálsav. A második legintenzívebb fragmens a GlcNAc hasadásából származó, 101 Da veszteséget eredményező hasadás, 1060-as m/z-jű fragmens. A fent említett kettő fragmensen kívül a többi fragmens intenzitása alacsony, és intenzitásuk változása nem értékelhető az egyes izoformák összehasonlításában.

A sziálsav eltérő fragmentációs tulajdonsága az izoformok esetében a sziálsav és galaktóz közötti eltérő kötéstípusból származhat. A B_3-as, 655-ös m/z-jű fragmens molekulaionhoz viszonyított eltérő intenzitása a mannóz és GlcNAc közötti eltérő kötéstípusból is származhat.



25. ábra: A TriS3 izomereinek tandem MS spektumai
(grafitoszlopos analízis, negatív ionizáció, ütközési energia: 50 eV)

A TriS3 valamennyi bemutatott izomer-spektuma 50 eV ütközési energia alkalmazása mellett készült, a kétszeresen töltött molekulaion nem detektálható. A TriS3 legintenzívebb fragmensei a sziálsav hasadására és a GlcNAc hasadására vezethetők vissza. A B1-es fragmensen (209-es m/z) kívül az $^{1,5}A_2$ fragmens (424-es m/z) és a $^{0,2}A_7/Y_6$ (1242 m/z) fragmens esetében is lejátszódik a sziálsav vesztése. A molekulaionhoz viszonyított intenzitások hasonlóságának oka a megegyező fragmentációs lépés, a sziálsav hasadása lehet.

Az AGP-ről lehasított oligoszacharidok fragmentációját vizsgálva azt a megállapítást tehetjük, hogy a B_1 és $^{0,2}A$ fragmensek előfordulása gyakori a spektrumokban, a fragmensek molekulaionhoz viszonyított intenzitása is viszonylag magas. A spektrumokban ritkán találunk X, illetve Z hasadásra jellemző fragmenseket.

A 306-os m/z értékkel jellemezhető fragmens, ami a sziálsav kötéstípus alapján történő megkülönböztetésében iránymutató, értékelhetetlen intenzitással fordul elő a spektrumokban vagy nincs jelen. A különböző izomerek fragmentáció alapján történő azonosítása a bemutatott spektrumok alapján nem lehetséges. Az egyes izoformok esetében a fragmensek intenzitásbeli különbségei az eltérő kötéstípusokra utalhatnak, de az izoformok pontos szerkezetbeli azonosítására nem alkalmasak.

VI. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatásaink során meglévő folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás módszert alkalmaztunk az AGP biomarker jellegének feltárására. A folyadékkromatográfia az izoformok elválasztását, a tömegspektrometria a pontos szerkezet-meghatározást tette lehetővé.

1.1. Elvégeztük az AGP genetikai variánsainak analízisét egészséges és daganatos betegek esetében. A daganatos betegcsoportokat a limfómás, ováriumtumoros és melanómás betegcsoportok képezték. Az alkalmazott folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás módszer lehetővé tette a genetikai variánsok arányának meghatározását, az ORM1 és ORM2 variánsok expressziójának összehasonlítását. Megállapítottuk, hogy az egészséges és a daganatos betegségben szenvedő csoportok között különbség található az AGP plazmaszintjében.

1.2 Különbséget találtunk az ORM1/ORM2 arányban az egészséges és a daganatos betegcsoportok között, ugyanakkor nem volt jelentős eltérés a betegcsoportok esetében a genetikai variánsok arányában.

1.3. Szignifikáns különbséget határoztunk meg variancia-analízissel az ORM2 százalékos megoszlásában az egészséges és a betegcsoportok között, ugyanakkor nem találtunk szignifikáns különbséget a daganatos betegcsoportok között.

1.4. Megállapítottuk, hogy a különböző lókuszhoz rendelhető genetikai variánsok mennyisége nem azonos mértékben növekszik, hanem az ORM1 variánsok expressziója fokozottabb mértékű, mint az ORM2 variánsé.

1.5. Kutatásaink eredményei alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az egyes patológiás elváltozásokban bekövetkező AGP koncentráció-emelkedésért és az AGP akut fázis fehérje jellegéért nagyobb mértékben az ORM1 variánsok tehetők felelőssé.

2.1. Az AGP glikozilációs mintázatának analíziséhez folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás analízist dolgoztunk ki. Az AGP komplex, N-glikánjainak hasítására enzimatikus módszert optimalizáltunk.

2.2. A lehasított oligoszacharidok tiszítására grafittöltetű szilárd fázisú extrakciós módszert fejlesztettünk ki.

2.3. Megállapítottuk, hogy a komplex oligoszacharidok analízisére a grafitoszloppal kapcsolt tömegspektrometria részletesebb szerkezeti információkat nyújt, mint a fordított fázisú oszloppal kapcsolt tömegspektrometria.

2.4. Az AGP emésztményből tömegspektrometria segítségével 18 különböző monoszacharid-összetételű oligoszacharidot detektáltunk.

2.5. A grafitoszlop alkalmazásával és a folyadékkromatográfiás módszer optimalizálásával ugyanakkor az oligoszacharidok egyes izoformjait is el tudtuk választani egymástól.

2.6. A tandem tömegspektrometriás mérések az oligoszacharidokról részletes szerkezeti információt nyújtottak. Az egyes izoformok fragmenseinek a molekulaionhoz viszonyított eltérő intenzitása, a különböző szerkezeti tulajdonságokra, az eltérő kötéstípusra utal.

A kifejlesztett módszer alkalmas glikoproteinekről lehasított komplex, N-glikánok szerkezeti heterogenitásainak jellemzésére és az egyes oligoszacharidok izoformjainak elválasztására. A glikozilációs mintázat heterogenitásaiban bekövetkező eltérések különböző biológiai funkcióra utalnak, ezek diagnosztikus értékét a jövőben kívánjuk megvizsgálni.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásaink során az alfa-1 savas glikoprotein (AGP) izoformjait vizsgáltuk folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (LC-MS) módszerrel.

A genetikai variánsok arányának meghatározását végeztük el egészséges és különböző daganatos betegségben szenvedő egyéneken. Az ORM1/ORM2 arány eltérése az egészséges és a daganatos betegcsoportban jelzi, hogy a genetikai variánsok mennyiségbeli növekedésének a mértéke nem azonos. Szignifikáns különbséget találtunk az ORM2 variáns arányában az egészséges és a daganatos betegcsoportok között. Kutatásaink eredményei igazolják, hogy az AGP akut fázis fehérje jellegéért nagyobb mértékben tehetők felelőssé az ORM1 variánsok, mint az ORM2 variáns. Kutatómunkánk során nem egyes glikoproteinek/proteinek megléte vagy hiánya alapján jellemeztünk egyes patológiás állapotokat, hanem egy glikoprotein, az AGP izoformjainak meghatározásával [1].

A glikoproteinek glikozilációs mintázatának jellemzésére LC-MS módszert dolgoztunk ki. Tömegspektrometriás detektálással az oligoszacharidok molekulatömeg alapján történő pontos analízisét végeztük el. Grafitoszlop alkalmazásával lehetővé vált az oligoszacharidok izoformjainak elválasztása. Az oligoszacharidok izoformjainak fragmentációját tandem MS mérésekkel vizsgáltuk.

A kidolgozott módszerrel lehetővé válik biológiai minták glikozilációjának részletes jellemzése, a glikoproteinekről lehasított komplex oligoszacharidok szerkezeti mikroheterogenitásainak analízise [2].

1. Budai L, Ozohanics O, Ludányi K, Drahos L, Kremmer T, Krenyacz J, Vékey K. (2009) Investigation of genetic variants of α-1 acid glycoprotein by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Anal Bioanal Chem, 393: 991-998.

2. Budai L, Pollreisz F, Ozohanics O, Ludányi K, Drahos L, Vékey K. (2008) Analysis of complex oligosaccharides using graphitized carbon liquid chromatography/mass spectrometry. Eur J Mass Spectrom, 14: 419-422.

VIII. SUMMARY

The investigation of the isoforms of the alpha-1 acid glycoprotein (AGP) was carried out with liquid chromatography coupled to mass spectrometry technique (LC-MS).

We have determined the ratio of the genetic variants in healthy individuals and in cancerous patients. The different ORM1/ORM2 ratio in healthy and in cancerous groups indicate that the level of the increase of the genetic variants is not equal. Significant difference was found in the proportion of ORM2 variant comparing the healthy individuals to the cancerous groups. The results of our study confirm that the ORM1 variants are more responsible for the acute phase response of the AGP than ORM2 variant.

In our research pathological conditions were characterized not by establishing the presence or the absence of a protein or glycoprotein, but it was based on the glycosylation isoforms of an important plasma glycoprotein, the AGP [1].

In order to characterize the glycosylation pattern of glycoproteins we worked out an LC-MS method. With the mass spectrometric detection we identified the oligosaccharides measuring the molecular masses. The separation of certain isoforms of oligosaccharides was possible applying graphitized carbon column. The fragmentation of the isoforms of oligosaccharides were measured with tandem MS.

With the use of our LC-MS method, detailed characterization of the glycosylation pattern in biological samples became possible, by characterizing the major and minor microheterogeneities of the corresponding oligosaccharides [2].

1. Budai L, Ozohanics O, Ludányi K, Drahos L, Kremmer T, Krenyacz J, Vékey K. (2009) Investigation of genetic variants of α-1 acid glycoprotein by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Anal Bioanal Chem, 393: 991-998.

2. Budai L, Pollreisz F, Ozohanics O, Ludányi K, Drahos L, Vékey K. (2008) Analysis of complex oligosaccharides using graphitized carbon liquid chromatography/mass spectrometry. Eur J Mass Spectrom, 14: 419-422.

IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ceciliani F, Pocacqua V. (2007) The acute phase protein alpha 1-acid glycoprotein: A model for altered glycosylation during diseases. Curr Prot & Pept Sci, 8: 91-108.
2. Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. (2000) Alpha-1-acid glycoprotein. Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol, 1482: 157-171.
3. Treuheit MJ, Costello CE, Halsall HB. (1992) Analysis of the 5 Glycosylation Sites of Human Alpha-1-Acid Glycoprotein. Biochem J, 283: 105-112.
4. Ivanov AI, Steiner AA, Patel S, Rudaya AY, Romanovsky AA. (2005) Albumin is not an irreplaceable carrier for amphipathic mediators of thermoregulatory responses to LPS: compensatory role of alpha(1)-acid glycoprotein. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 288: R872-R878.
5. Kopecky V, Ettrich R, Hofbauerova K, Baumruk V. (2003) Structure of human alpha(1)-acid glycoprotein and its high-affinity binding site. Biochem. Biophys. Res. Commun., 300: 41-46.
6. Israili ZH, Dayton PG. (2001) Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. Drug Metab. Rev., 33: 161-235.
7. Jones K, Hoggard PG, Khoo S, Maher B, Back DJ. (2001) Effect of alpha(1)-acid glycoprotein on the intracellular accumulation of the HIV protease inhibitors saquinavir, ritonavir and indinavir in vitro. Br. J. Clin. Pharmacol., 51: 99-102.
8. Gambacorti-Passerini C, Zucchetti M, Russo D, Frapolli R, Verga M, Bungaro S, Tornaghi L, Rossi F, Pioltelli P, Pogliani E, Alberti D, Corneo G, D'Incalci M. (2003) alpha 1 acid glycoprotein binds to imatinib (ST1571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. Clin Cancer Res, 9: 625-632.
9. Hochepied T, Berger FG, Baumann H, Libert C. (2003) alpha(1)-Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. Cytokine & Growth Factor Rev, 14: 25-34.
10. Shiyan SD ,Bovin NV. (1997) Carbohydrate composition and immunomodulatory activity of different glycoforms of alpha(1)-acid glycoprotein. Glycoconjugate J, 14: 631-638.
11. Tilg H, Vannier E, Vachino G, Dinarello CA, Mier JW. (1993) Antiinflammatory Properties of Hepatic Acute-Phase Proteins - Preferential Induction of Interleukin-1 (Il-1) Receptor Antagonist over Il-1-Beta Synthesis by Human Peripheral-Blood Mononuclear-Cells. J. Exp. Med., 178: 1629-1636.
12. Cheresh DA, Haynes DH, Distasio JA. (1984) Interaction of an Acute Phase Reactant, Alpha-1-Acid Glycoprotein (Orosomucoid), with the Lymphoid-Cell Surface - a Model for Non-Specific Immune Suppression. Immunology, 51: 541-548.
13. Yuasa I, Umetsu K, Vogt U, Nakamura H, Nanba E, Tamaki N, Irizawa Y. (1997) Human orosomucoid polymorphism: Molecular basis of the three common ORM1 alleles, ORMI(*)F1, ORM1(*)F2, and ORM1(*)S. Hum Genet, 99: 393-398.

14. Eap CB, Cuendet C, Baumann P. (1988) Orosomucoid (Alpha-1 Acid Glycoprotein) Phenotyping by Use of Immobilized Ph Gradients with 8-M Urea and Immunoblotting - a New Variant Encountered in a Population Study. Hum. Genet, 80: 183-185.
15. Fitos I, Visy J, Zsila F, Bikadi Z, Mady G, Simonyi M. (2004) Specific ligand binding on genetic variants of human alpha(1)-acid glycoprotein studied by circular dichroism spectroscopy. Biochem Pharm, 67: 679-688.
16. Eap CB, Fischer JF, Baumann P. (1991) Variations in Relative Concentrations of Variants of Human Alpha-1-Acid Glycoprotein after Acute-Phase Conditions. Clin Chim Acta, 203: 379-386.
17. Duche JC, Herve F, Tillement JP. (1998) Study of the expression of the genetic variants of human alpha(1)-acid glycoprotein in healthy subjects using isoelectric focusing and immunoblotting. J Chrom B, 715: 103-109.
18. Duche JC, Urien S, Simon N, Malaurie E, Monnet I, Barre J. (2000) Expression of the genetic variants of human alpha-1-acid glycoprotein in cancer. Clin Biochem, 33: 197-202.
19. Vandijk W, Pos O, Vanderstelt ME, Moshage HJ, Yap SH, Dente L, Baumann P, Eap CB. (1991) Inflammation-Induced Changes in Expression and Glycosylation of Genetic-Variants of Alpha-1-Acid Glycoprotein - Studies with Human Sera, Primary Cultures of Human Hepatocytes and Transgenic Mice. Biochem J, 276: 343-347.
20. Zsila F, Molnar P, Deli J, Lockwood SF. (2005) Circular dichroism and absorption spectroscopic data reveal binding of the natural cis-carotenoid bixin to human alpha(1)-acid glycoprotein. Bioorg Chem, 33: 298-309.
21. Taheri S, Cogswell LP, Gent A, Strichartz GR. (2003) Hydrophobic and ionic factors in the binding of local Anesthetics to the major variant of human alpha(1)-acid glycoprotein. J. Pharmacol. Exp. Ther, 304: 71-80.
22. Kuroda Y, Shibukawa A, Nakagawa T. (2003) Drug binding analysis of human alpha(1)-acid glycoprotein using capillary electrophoresis. Yakugaku Zasshi-J. Pharm Soc Japan, 123: 781-788.
23. Kimura T, Shibukawa A, Matsuzaki K. (2006) Biantennary glycans as well as genetic variants of alpha(1)-acid glycoprotein control the enantioselectivity and binding affinity of oxybutynin. Pharm Res, 23: 1038-1042.
24. Hanada K, Tochikura N, Ogata H. (2007) Selective binding of tamsulosin to genetic variants of human alpha(1)-acid glycoprotein. Biol & Pharm Bulletin, 30: 1593-1595.
25. Kuroda Y, Matsumoto S, Shibukawa A, Nakagawa T. (2003) Capillary electrophoretic study on pH dependence of enantioselective disopyramide binding to genetic variants of human alpha(1)-acid glycoprotein. Analyst, 128: 1023-1027.
26. Hanada K, Ohta T, Hirai M, Arai M, Ogata H. (2000) Enantioselective binding of propranolol, disopyramide, and verapamil to human alpha(1)-acid glycoprotein. J Pharm Sci, 89: 751-757.
27. Hazai E, Visy J, Fitos I, Bikadi Z, Simonyi M. (2006) Selective binding of coumarin enantiomers to human alpha(1)-acid glycoprotein genetic variants. Bioorg & Med Chem, 14: 1959-1965.
28. Johnson JA, Livingston TN. (1997) Differences between blacks and whites in plasma protein binding of drugs. Eur J Clin Pharmacol, 51: 485-488.

29. Fitos I, Visy J, Zsila F, Mady G, Simonyi M. (2006) Selective binding of imatinib to the genetic variants of human alpha(1)-acid glycoprotein. Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj, 1760: 1704-1712.
30. Fitos I, Visy J, Zsila F, Mady G, Simonyi M. (2007) Conformation selectivity in the binding of diazepam and analogues to alpha(1)-acid glycoprotein. Bioorg & Med Chem, 15: 4857-4862.
31. Cogswell LP, Raines DE, Parekh S, Jonas O, Maggio JE, Strichartz GR. (2001) Development of a novel probe for measuring drug binding to the F1*S variant of human alpha 1-acid glycoprotein. J Pharm Sci, 90: 1407-1423.
32. Taylor ME, Drickamer K. Introduction to Glycobiology. Oxford University Press, Oxford, New York, 2003: 1-57.
33. Imre T, Kremmer T, Heberger K, Molnar-Szollosi E, Ludanyi K, Pocsfalvi G, Malorni A, Drahos L, Vekey K. (2008) Mass spectrometric and linear discriminant analysis of N-glycans of human serum alpha-1-acid glycoprotein in cancer patients and healthy individuals. J. Proteomics, 71: 186-197.
34. Imre T, Schlosser G, Pocsfalvi G, Siciliano R, Molnar-Szollosi E, Kremmer T, Malorni A, Vekey K. (2005) Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. J. Mass Spectrom., 40: 1472-1483.
35. Nakano M, Kakehi K, Tsai MH, Lee YC. (2004) Detailed structural features of glycan chains derived from alpha 1-acid glycoproteins of several different animals: the presence of hypersialylated, O-acetylated sialic acids but not disialyl residues. Glycobiology, 14: 431-441.
36. Villar-Garea A, Griese M, Imhof A. (2007) Biomarker discovery from body fluids using mass spectrometry. J Chromatogr B-Anal Techn Biomed Life Sci, 849: 105-114.
37. Van Dijk W, Brinkman-Van der Linden ECM, Havenaar EC. (1998) Glycosylation of alpha(1)-acid glycoprotein (orosomucoid) in health and disease: Occurrence, regulation and possible functional implications. Trends in Glycosci Glycotechn, 10: 235-245.
38. Davis MT, Auger P, Spahr C, Patterson SD. (2007) Cancer biomarker discovery via low molecular weight serum proteome profiling - Where is the tumor? Proteom Clin Appl, 1: 1545-1558.
39. Haston JL, FitzGerald O, Kane D, Smith KD. (2002) Preliminary observations on the influence of rheumatoid alpha-1-acid glycoprotein on collagen fibril formation. Biomed Chromatogr, 16: 332-342.
40. Hashimoto S, Asao T, Takahashi J, Yagihashi Y, Nishimura T, Saniabadi AR, Poland DCW, van Dijk W, Kuwano H, Kochibe N, Yazawa S. (2004) alpha(1)-acid glycoprotein fucosylation as a marker of carcinoma progression and prognosis. Cancer, 101: 2825-2836.
41. Daemen M, Heemskerk VH, van 't Veer C, Denecker G, Wolfs T, Vandenabeele P, Buurman WA. (2000) Functional protection by acute phase proteins alpha(1)-acid glycoprotein and alpha(1)-antitrypsin against ischemia/reperfusion injury by preventing apoptosis and inflammation. Circulation, 102: 1420-1426.
42. VanMolle W, Libert C, Fiers W, Brouckaert P. (1997) alpha(1)-acid glycoprotein and alpha(1)-antitrypsin inhibit TNF-induced but not anti-Fas-induced apoptosis of hepatocytes in mice. J Immunology, 159: 3555-3564.

43. Azuma Y, Sakanashi M, Matsumoto K. (2001) The effect of alpha 2,6-linked sialic acid on anti-IgM antibody-induced apoptosis in Ramos cells. Glycoconjugate J, 18: 419-424.
44. Chen CH. (2008) Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. Anal Chim Acta, 624: 16-36.
45. Budnik BA, Lee RS, Steen JAJ. (2006) Global methods for protein glycosylation analysis by mass spectrometry. Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics, 1764: 1870-1880.
46. Geyer H, Geyer R. (2006) Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics, 1764: 1853-1869.
47. Morelle W, Canis K, Chirat F, Faid V, Michalski JC. (2006) The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation. Proteomics, 6: 3993-4015.
48. Aldred S, Grant MM, Griffiths HR. (2004) The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research. Clin Biochem, 37: 943-952.
49. Rehulka P, Salplachta J, Chmelik J. (2003) Improvement of quality of peptide mass spectra in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and post-source decay analysis of salty protein digests by using on-target washing. J Mass Spectrom, 38: 1267-1269.
50. Vékey K, Telekes A, Vertes A. Medical applications of mass spectrometry. Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Sydney, Tokyo, 2008: 7-18, 37-137, 173-220, 253-551.
51. Harvey DJ. (2001) Identification of protein-bound carbohydrates by mass spectrometry. Proteomics, 1: 311-328.
52. Wysocki VH, Resing KA, Zhang QF, Cheng GL. (2005) Mass spectrometry of peptides and proteins. Methods, 35: 211-222.
53. Chen GD, Pramanik BN. (2008) LC-MS for protein characterization: current capabilities and future trends. Expert Rev. Proteomics, 5: 435-444.
54. Romijn EP, Krijgsveld J, Heck AJR. (2003) Recent liquid chromatographic-(tandem) mass spectrometric applications in proteomics. J. Chromatogr. A, 1000: 589-608.
55. Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C. (1993) Identifying Proteins from 2-Dimensional Gels by Molecular Mass Searching of Peptide-Fragments in Protein-Sequence Databases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90: 5011-5015.
56. Kremmer T, Boldizsar M, Kovacs J, Paulik E, Bencsik K, Szajani B. (1995) Determination and Analysis of Human Serum Alpha-1-Acid Glycoprotein by Liquid-Chromatographic Methods. J Liq Chromatogr, 18: 1207-1218.
57. Kremmer T, Szollosi E, Boldizsar M, Vincze B, Ludanyi K, Imre T, Schlosser G, Vekey K. (2004) Liquid chromatographic human serum acid and mass spectrometric analysis of alpha-1-glycoprotein. Biomed Chromatogr, 18: 323-329.
58. Szollosi T, Kremmer T, Ludanyi K, Imre T, Schlosser G, Boldizsar M, Vincze B, Vekey K. (2004) A novel method for the separation and purification of human serum acid alpha-1-glycoprotein. Liquid chromatographic and mass spectrometric investigation of tryptic fragments. Chromatographia, 60: S213-S219.

59. Luque-Garcia JL, Neubert TA. (2007) Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry. J Chromatogr A, 1153: 259-276.
60. Zaia J. (2008) Mass Spectrometry and the Emerging Field of Glycomics. Chem. Biol., 15: 881-892.
61. Nana K, Itoh S, Harazono A, Hashii N, Matsuishi Y, Hayakawa T, Kawanishi T. (2005) Mass spectrometry of glycoproteins. Trends Glycosci. Glycotechnol., 17: 193-203.
62. Zaia J. (2004) Mass spectrometry of oligosaccharides. Mass Spectrom. Rev., 23: 161-227.
63. Liu X, McNally DJ, Nothaft H, Szymanski CM, Brisson JR, Li JJ. (2006) Mass spectrometry-based glycomics strategy for exploring N-linked glycosylation in eukaryotes and bacteria. Anal Chem, 78: 6081-6087.
64. Morelle W, Michalski JC. (2005) The mass spectrometric analysis of glycoproteins and their glycan structures. Curr Anal Chem, 1: 29-57.
65. Hirabayashi J ,Kasai K. (2002) Separation technologies for glycomics. J. Chromatogr. B, 771: 67-87.
66. Harvey DJ. (2005) Proteomic analysis of glycosylation: structural determination of N- and O-linked glycans by mass spectrometry. Expert Rev. Proteomics, 2: 87-101.
67. Packer NH, Lawson MA, Jardine DR, Redmond JW. (1998) A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins. Glycoconjugate J, 15: 737-747.
68. Robinson S, Bergstrom E, Seymour M, Thomas-Oates J. (2007) Screening of underivatized oligosaccharides extracted from the stems of Triticum aestivum using porous graphitized carbon liquid chromatography-mass spectrometry. Anal Chem, 79: 2437-2445.
69. Wuhrer M, Deelder AM, Hokke CH. (2005) Protein glycosylation analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatog B-Anal Techn Biomed Life Sci, 825: 124-133.
70. Chen XY, Flynn GC. (2007) Analysis of N-glycans from recombinant immunoglobulin G by on-line reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Anal Biochem, 370: 147-161.
71. Kim YG, Jang KS, Joo HS, Kim HK, Lee CS, Kim BG. (2007) Simultaneous profiling of N-glycans and proteins from human serum using a parallel-column system directly coupled to mass spectrometry. J Chromatogr B-Anal TechnBiomed Life Sci, 850: 109-119.
72. Hanai T. (2003) Separation of polar compounds using carbon columns. J Chromatogr A, 989: 183-196.
73. Hennion MC. (2000) Graphitized carbons for solid-phase extraction. J Chromatogr A, 885: 73-95.
74. Pabst M, Bondili JS, Stadlmann J, Mach L, Altmann F. (2007) Mass plus retention time = structure: A strategy for the analysis of N-glycans by carbon LC-ESI-MS and its application to fibrin N-glycans. Anal Chem, 79: 5051-5057.
75. Fan JQ, Kondo A, Kato I, Lee YC. (1994) High-Performance Liquid-Chromatography of Glycopeptides and Oligosaccharides on Graphitized Carbon Columns. Anal Biochem, 219: 224-229.

76. Karlsson NG, Wilson NL, Wirth HJ, Dawes P, Joshi H, Packer NH. (2004) Negative ion graphitised carbon nano-liquid chromatography/mass spectrometry increases sensitivity for glycoprotein oligosaccharide analysis. Rapid Commun. Mass Spectrom, 18: 2282-2292.
77. Ruhaak LR, Deelder AM, Wuhrer M. (2009) Oligosaccharide analysis by graphitized carbon liquid chromatography-mass spectrometry. Anal Bioanal Chem, 394: 163-174.
78. Kawasaki N, Ohta M, Hyuga S, Hashimoto O, Hayakawa T. (1999) Analysis of carbohydrate heterogeneity in a glycoprotein using liquid chromatography mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Anal Biochem, 269: 297-303.
79. Wilson NL, Schulz BL, Karlsson NG, Packer NH. (2002) Sequential analysis of N- and O-linked glycosylation of 2D-PAGE separated glycoproteins. J Proteome Res, 1: 521-529.
80. Itoh S, Kawasaki N, Ohta M, Hyuga M, Hyuga S, Hayakawa T. (2002) Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A, 968: 89-100.
81. Karlsson NG, Packer NH. (2002) Analysis of O-linked reducing oligosaccharides released by an in-line flow system. Anal Biochem, 305: 173-185.
82. Morelle W, Michalski JC. (2005) Glycomics and mass spectrometry. Curr. Pharm. Design, 11: 2615-2645.
83. Domon B, Costello CE. (1988) A Systematic Nomenclature for Carbohydrate Fragmentations in Fab-Ms Ms Spectra of Glycoconjugates. Glycoconjugate J, 5: 397-409.
84. Wheeler SF, Harvey DJ. (2000) Negative ion mass spectrometry of sialylated carbohydrates: Discrimination of N-acetylneuraminic acid linkages by MALDI-TOF and ESI-TOF mass spectrometry. Anal Chem, 72: 5027-5039.

X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

X. 1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

X. 1.1. Publikációk

Lívia Budai, Olivér Ozohanics, Krisztina Ludányi, László Drahos, Tibor Kremmer, Judit Krenyácz, Károly Vékey:
Investigation of genetic variants of α-1 acid glycoprotein by ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry
Analytical and Bioanalytical Chemistry 393 (2009) 991–998.
IF: 3.328

Lívia Budai, Ferenc Pollreisz, Olivér Ozohanics, Krisztina Ludányi, László Drahos, Károly Vékey:
Analysis of complex oligosaccharides using graphitized carbon liquid chromatography/mass spectrometry
European Journal of Mass Spectrometry, 14 (2008) 419-422.
IF: 1.167

X. 1.2. Előadások

Budai Lívia:
Az alfa-1 savas glikoprotein oligoszacharid-struktúráinak tömegspektrometriás analízise
IX. Clauder Ottó Emlékverseny - Különdíj
Budapest, 2009. április 23-24.

Károly Vékey, Olivér Ozohanics, **Lívia Budai**, László Drahos:
Glycosylation, mass spectrometry and informatics
8. Igler MS Tage organized by the Institute of Organic Chemistry, University of Innsbruck
Obergurgl, 2009. február 22-25.

Ozohanics Olivér, **Budai Lívia**, Krenyácz Judit, Ludányi Krisztina, Kremmer Tibor, Vékey Károly, Drahos László:
Az alfa-1 savas glikoprotein genetikai variánsainak vizsgálata
Kutatóközponti Tudományos Napok
MTA Kémiai Kutatóközpont
Budapest, 2008. december 3-5.

Ozohanics Olivér, Krenyácz Judit, **Budai Lívia**, Ludányi Krisztina, Kremmer Tibor, Vékey Károly és Drahos László:
Az alfa-1 savas glikoprotein genetikai variánsainak vizsgálata
Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2008
Sárvár, 2008. november 5-7.

Ozohanics Olivér, Krenyácz Judit, **Budai Lívia**, Ludányi Krisztina, Kremmer Tibor, Vékey Károly és Drahos László:
Analysis of genetic variants of α-1 acid glycoprotein in cancer
Second Central and Eastern European Proteomic Conference
Jéna, 2008. október 12-15.

Károly Vékey, László Drahos, Olivér Ozohanics, **Lívia Budai**, Judit Krenyácz, Krisztina Ludányi, Júlia Visy, Tibor Kremmer:
Mass spectrometric investigation of structural variants of alpha-1 acid glycoprotein
MTA Kémiai Kutatóközpont Nemzetközi Tudományos Tanácsadó Testületének nyilvános tudományos ülése
Budapest, 2008. május 20-22.

Budai Lívia, Pollreisz Ferenc, Ozohanics Olivér, Imre Tímea, Pavel Rehulka, Helena Rehulkova, Kremmer Tibor, Ludányi Krisztina, Drahos László, Vékey Károly:
Az alfa-1 savas glikoprotein oligoszacharid-struktúráinak tömegspektrometriás vizsgálata
Semmelweis Egyetem PhD Tudományos Napok - Különdíj
Budapest, 2008. április 10-11.

Drahos László, Krenyácz Judit, Nagy Kornél, Ozohanics Olivér, **Budai Lívia**, Kremmer Tibor, Ludányi Krisztina, Imre Tímea, Vékey Károly:
Glikoprotein biomarkerek tömegspektrometriás vizsgálata
XXXVIII. Kromatográfiás továbbképző tanfolyam
MTA Szegedi Akadémiai Bizottság Székháza
Szeged, 2007. január 29-31.

Drahos László, Krenyácz Judit, Ozohanics Olivér, **Budai Lívia**, Kremmer Tibor, Ludányi Krisztina, Vékey Károly:
Glikoprotein biomarkerek tömegspektrometriás vizsgálata
A Magyar Proteomikai Társaság Vándorgyűlése
Villány, 2006. november 23-24.

X. 1.3. Poszterek

Budai Lívia, Ozohanics Olivér, Ludányi Krisztina, Drahos László, Vékey Károly:
Az alfa-1 savas glikoprotein glikozilációs mintázatának vizsgálata
Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV.
Budapest, 2009. november 13-15.

Lívia Budai, Ferenc Pollreisz, Oliver Ozohanics, Krisztina Ludányi, László Drahos, Károly Vékey:
Glycosylation pattern analysis with mass spectrometry
OBEKON symposium
Budapest, 2009. október 1-3.

Lívia Budai, Ferenc Pollreisz, Olivér Ozohanics, Krisztina Ludányi, László Drahos, Károly Vékey:
Mass spectrometric analysis of oligosaccharides of alpha-1 acid glycoprotein
27th Informal Meeting on Mass Spectrometry
Austria, Retz, 2009. május 3-7.

Budai Lívia, Pollreisz Ferenc, Ozohanics Olivér, Ludányi Krisztina, Drahos László, Vékey Károly:
Oligoszacharidok tömegspektrometriás analízise
Semmelweis Egyetem PhD Tudományos Napok
Budapest, 2009. március 30-31.

Budai Lívia, Pollreisz Ferenc, Ozohanics Olivér, Kremmer Tibor, Budai Marianna, Ludányi Krisztina, Drahos László, Vékey Károly:
Komplex oligoszacharidok elválasztása grafitoszlopon
Elválasztástudományi Vándorgyűlés, 2008
Sárvár, 2008. november 5-7.

X. 2. Egyéb közlemények jegyzéke

Marianna Budai, Mária Hajdú, **Lívia Budai**, István Antal, Katalin Lenti, Imre Klebovich:
Liposomal hydrogels and soft contact lenses for the delivery of antibiotics in ophthalmology
Nova Science Publishers, Inc., USA
Hydrogels: Properties, Preparation and Applications
Book chapter, *In press* (2009)

Marianna Budai, Patricia Chapela, **Lívia Budai,** Melinda E. Wales, Ilona Petrikovics, Andreas Zimmer, Pál Gróf, Imre Klebovich, Maria Szilasi:
Liposomal oxytetracycline and doxycycline: studies on enhancement of encapsulation efficiency
Drug Discoveries and Therapeutics 3 (2009) 13-17.

I. Petrikovics, M. Budai, S.I. Baskin, G.A. Rockwood, J. Childress, **L. Budai**, P. Gróf, I. Klebovich, M. Szilasi:
Characterization of liposomal vesicles encapsulating rhodanese for cyanide antagonism
Drug Delivery 16 (2009) 312-319.
IF: 1.550

Kaszás Nóra, Budai Marianna, **Budai Lívia**, Gróf Pál, Andreas Zimmer, Klebovich Imre:
A bezárási hatásfok növelésének lehetőségei liposzómába zárt lomefloxacinnál
Acta Pharmaceutica Hungarica 78 (2008) 69-74.

Lívia Budai, Mária Hajdú, Marianna Budai, Pál Gróf, Szabolcs Béni, Béla Noszál, Imre Klebovich, István Antal:
Gels and liposomes in optimized ocular drug delivery: Studies on ciprofloxacin formulations
International Journal of Pharmaceutics 343/1-2 (2007) 34-40.
IF: 2.408

XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetem kifejezni mindazoknak, akik segítségemre voltak a dolgozatom elkészülésében.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Vékey Károly témavezetőmnek a rengeteg segítségért, az állandó támogatásért és odafigyelésért, amelyre a doktori munkám során mindig számíthattam.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Ludányi Krisztinának és Dr. Drahos Lászlónak a kutatómukám során nyújtott segítségükért és biztatásukért.

Köszönettel tartozom Dr. Pollreisz Ferencnek és Ozohanics Olivérnek a szakmai segítségükért, a közös munkáért és az elért eredményekért.

Köszönettel tartozom Kremmer Tibornak, hogy a humán AGP mintákat a Tömegspektrometriai Osztály rendelkezésére bocsátotta kutatási célra.

Köszönetem fejezem ki minden kedves kollégámnak (Antony Memboeuf, Gömöry Ágnes, Grádné Szabó Rita, Imre Tímea, Kiss András, Nyíri Kinga, Turiák Lilla, Újszászy Kálmán), akik segítségére mindig számíthattam és akik hozzájárultak ahhoz, hogy doktori munkám kellemes környezetben végezhessem.

Szeretnék köszönetet mondani szüleimnek és nővéremnek, hogy rájuk mindig számíthattam, tőlük minden erkölcsi biztatást és anyagi támogatást megkaptam, ami lehetővé tette, hogy biztos háttér mellett a doktori munkám teljes odafigyeléssel végezhessem.