

Tóth Gábor – Vékey Károly – Drahos László – Turiák Lilla

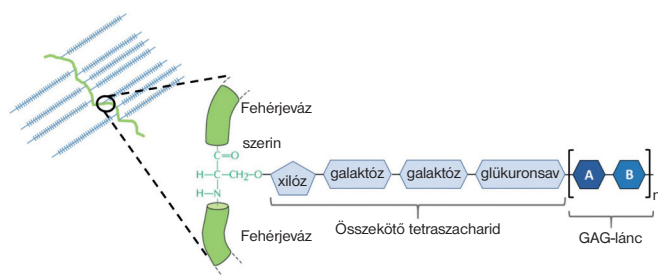
■ Természettudományi Kutatóközpont, Szerves Kémiai Intézet, MS Proteomika Kutatócsoport | toth.gabor@ttk.mta.hu | vekey.karoly@ttk.mta.hu | drahos.laszlo@ttk.mta.hu | turiak.lilla@ttk.mta.hu

A proteoglikánok és műszeres analitikai vizsgálatuk

A proteoglikánok felépítése, funkciói

A fehérjék napjaink egyik leginkább vizsgált vegyületei, orvosi, biológiai, kémiai és gyógyszer-tudományi irányokban egyaránt. A fehérjék biológiai funkciójuk betöltéséhez számos változáson mennek keresztül szintézisüket követően. Kialakul a másodlagos, harmadlagos és negyedleges szerkezet, a peptidlánc egyes terminusai enzimatikusan lehasadnak, valamint létrejönnek az ún. poszt-transzlációs módosulások (PTM-ek) a fehérjéken. A PTM olyan kovalens módosítást jelent, mely során nem fehérje jellegű csoportok kapcsolódnak a fehérjéhez vagy távoznak el róla. A leggyakoribb módosulások az oxidáció, nitrálódás, metiláció, acetyláció, ubikvitináció, glikoziláció és foszforiláció. A PTM-ek nem egyszerű „dekorációként” szolgálnak, hanem alapvetően befolyásolják az egyes fehérjék aktivitását, lokalizációját, élettidejét, valamint más fehérjékkel való kölcsönhatásait.

Napjainkban az egyik leggyakrabban vizsgált PTM a glikoziláció, amely során szénhidrát-szerkezetek kapcsolódnak a fehérje meghatározott aminosavjainak oldalláncához, és így glikoproteinek jönnek létre. Ezek egy alosztályát képezik a proteoglikánok, amelyek esetén nagyméretű lineáris poliszacharidok (glükózaminoglikánok, GAG-ok) kapcsolódnak a fehérjéjéhez. A kapcsolódás szerineknel, tetraszacharid összekötő régió keresztül történik. A proteoglikánok sematikus szerkezetét az **1. ábra** mutatja.



1. ábra. A proteoglikánok általános szerkezeti felépítése.

A központi fehérjéhez kapcsolódó GAG-ok ismétlődő diszacharid-egységekből állnak (A: hexuronsav/galaktóz, B: hexózamin)

A proteoglikánok két fő elhelyezkedési területe a sejt felszíne és az extracelluláris mátrix (ECM). Az ECM főbb komponensei a szakítószilárdságot és rugalmasságot biztosító rostba rendeződő fehérjék (pl. kollagének és elasztinok), a tapadást biztosító glikoproteinek (pl. fibronectin, laminin) és az erőhatásoknak ellenálló hidrogéles szerkezetet létrehozó proteoglikánok. A proteoglikánok változatos szerkezetüknek köszönhetően számos sejt-működést (például jelátvitelt, növekedést vagy apoptózist) befolyásoló funkcióval rendelkeznek.

Tumoros környezetben jelentős változások következnek be a proteoglikánok szerkezetében, azonban a változások okai és következményei jelenleg nem ismertek.

A fehérje-GAG interakciónak számos funkciója lehet: egyszerű immobilizálás vagy proteolízis elleni védelem, de akár a fehérje biológiai funkciójának szabályozása is. Az ilyen és más interakciók miatt a proteoglikánok számos biológiai folyamatban kritikus szerepet játszanak, például szervképzés a fejlődés embrionikus szakaszában, angiogenezis, véralvadás szabályozása vagy a lipidek metabolizmusa. Ez a széles szerepkör nagy érdeklődésre tart számot, a funkció és a szerkezet kapcsolatának megértése mind analitikai, mind biológiai szempontból érdekes és bonyolult feladat.

A proteoglikánok jelentős szerkezeti változatosságot mutatnak: számos fehérje alkothatja a vázat, egy vagy két GAG-osztályba tartozó poliszacharid is kapcsolódhat hozzájuk, a kapcsolódó GAG-láncok száma egytől (dekorin) több százig (aggrekan) terjedhet, valamint az egyes GAG-láncok szerkezete (szulfatáltsága) is nagy változatosságot mutat a bioszintézisük sajátosságai miatt. Mivel ezek a poliszacharidok gyakran jóval nagyobb méretűek a fehérjéknel, a létrejött proteoglikánok tulajdonságait jelentősen meghatározhatják a GAG-láncok. A GAG-ok jelentős élettani szerepet töltenek be növekedési faktorok és növekedési faktor receptorok ko-receptoraként. A GAG-ok legfontosabb szerepe immobilizált növekedési faktor gradiensek létrehozása és fenntartása, valamint a szerkezeti stabilitás segítése az ECM-ben.

A proteoglikánok vizsgálati lehetőségei

A proteoglikánok vizsgálata tradicionálisan immunológiai módszerekkel valósítható meg: már évtizedek óta rendelkezésre állnak az egyedi vegyületekre szelektív antitestek. Azonban napjainkban a műszeres analitikai technikák rohamos fejlődésével felmerül a kérdés, hogy lehetséges-e nagy áteresztőképességgel egyetlen mintából több – akár egymástól nagyon eltérő tulajdonságú – proteoglikán szerkezeti azonosítása és mennyiségi meghatározása. A célvegyületek nagy mérete miatt (akár több 100 kDa) jelenleg műszeres analitikai technikákkal nem lehetséges egészben (intakt módon) vizsgálni ezen vegyületeket. A glikánok fehérjéktől nagyon eltérő kémiai tulajdonságokkal bírnak szerkezet, oldhatóság, polaritás, stabilitás stb. tekintetében, így külön analitikai módszerek kifejlesztése szükséges a vizsgálatukhoz.

Elsőként nézzük meg a fehérjék vizsgálatát! Ennek legfőbb műszeres analitikai eszköze a tömegspektrometria (MS), mely során ún. lágy ionizációs technikák (ESI és MALDI) alkalmazása



szükséges. Általánosan használt, elválasztástechnikával kombinált módszer a nanoméretű, ultranagy nyomású folyadékkromatográfiával való kapcsolás (UHPLC–MS), amely lehetővé teszi komplex minták vizsgálatát, és egyes esetekben érzékenységnövekedést jelent a többi tömegspektrometriás módszerhez képest. Leggyakoribb megközelítés az ún. „bottom up” (lentől felfelé) technika, melynek alapja a fehérjék enzimatis hasítása peptidkékké. Ezt a folyamatot különböző proteolitikus enzimek segítségével végzik, a legáltalánosabban alkalmazottak a tripszin, kimotripszin, az endoproteináz Lys-C, Arg-C, Glu-C és Asp-N, valamint a pepszin. A keletkező peptidkeverékek tömegspektrometriás mérése során felvett eredmények ezután összevethetők a különböző adatbázisokban rendelkezésre álló *in silico* peptid-tömegspektrumokkal, így a szoftveres kiértékelés segítségével valószínűségi alapon meghatározhatóvá válik a mintákban azonosított peptidok (részleges) aminosavsorrendje. Ezután a jelen lévő karakterisztikus peptidok segítségével azonosíthatók a mintát alkotó fehérjék.

A peptidok elválasztására leggyakrabban két kromatográfiás technikát alkalmaznak. A fordított fázisú kromatográfia során a molekulák hidrofobicitása, míg a hidrofil interakciós kromatográfia (HILIC) során a vegyületek polaritása alapján történik az elválasztás. A két technikában kihasznált eltérő kölcsönhatások következtében ezek a módszerek egymást kiegészítő információt szolgáltatnak, így gyakori az alkalmazásuk kétdimenziós kromatográfiás elválasztásokban. Kijelenthető, hogy ugyan folyamatosan fejlődik a fehérjék azonosításának technikája, alapelveit tekintve sztenderdizált módon alkalmazható módszerek alakultak ki.

Ezzel ellentétes tendencia figyelhető meg a GAG-ok vizsgálata során, ugyanis a vegyületcsalád műszeres analitikai vizsgálata még kialakulóban van. Nem állnak rendelkezésre a teljes vegyületcsoportra általánosan alkalmazható munkafolyamatok, és jelenleg kizárólag néhány kutatócsoport foglalkozik a technikák fejlesztésével. Nézzük most ezek vizsgálati technikáit!

Négy alapvető GAG-osztály különböztethető meg: hialuronán, keratán-szulfát, kondroitin-szulfát/dermatán-szulfát, és heparán-szulfát/heparin. A különböző osztályok műszeres analitikai vizsgálata hasonló alapokon nyugszik. A kis méretű (max. 20 kDa) láncok meghatározása megvalósítható – elektroforetikus vagy folyadékkromatográfiás elválasztást követően – elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával vagy speciális technikákat alkalmazó MALDI tömegspektrometriával. Azonban általánosságban a vizsgálandó láncok jóval hosszabbak, tömegük akár a 100 kDa-t is meghaladja. Ezért vizsgálatukhoz elengedhetetlen enzimatis hasítási lépés alkalmazása a minták előkészítése során, így elérhető egy jóval kisebb változatosságot hordozó diszacharid- vagy oligoszacharid-keverék vizsgálata. Alkalmazott enzimek például a hialuronidáz, a kondroitináz-ABC, vagy a heparin-liáz enzimek.

Az enzimatis emésztés két mechanizmus alapján történhet. A GAG-liázok eliminatív mechanizmussal hasítanak, így kialakul egy telítetlen kötést hordozó hexóz-egység a molekula nemredukáló végén. A GAG endohidrolázok azonban hidrolízis során telített csoportot eredményeznek a redukáló és a nemredukáló molekulavégén is.

Kiemelnék példaként a legnagyobb szerkezeti változatosságot mutató heparán-szulfát (HS) osztályt, ahol a bioszintézis során a poliszacharid-lánc mentén kialakulnak szulfatált és nem szulfatált régiók, és ezek aránya és váltakozása meghatározó jelátviteli információt hordoz. A HS-láncok emésztéséhez három külön-

böző bakteriális liáz enzim érhető el a kereskedelmi forgalomban. Mindhárom a glükózamin-hexóz kötést hasítja, azonban a degradáció helye eltérő. A Heparin-liáz I az N-szulfatált régióban hasítja, a Heparin-liáz III az N-acetilált régiót fejt ki aktivitását, míg a Heparin-liáz II-nek mindkét régióra nézve van némi katalitikus aktivitása.

Az enzimatis emésztést követően keletkező diszacharidok analíziséhez számos elválasztástechnikai módszer áll rendelkezésre. Néhány példát kiemelve: fordított fázisú kromatográfia (származékképzés után vagy ionpárképzéssel), méretkizárásos kromatográfia (SEC) és a különösen poláros vegyületekre gyakran alkalmazott porózus grafit- (PGC) vagy amid-HILIC kromatográfia. Azonban ezen módszereknek számos hátránya van. A fordított fázisú elválasztáshoz a diszacharidok származékképzése szükséges, amely a többlépcsős kémiai folyamat miatt jelentős mintavesztést okoz, míg az ionpárképzés kerülendő a tömegspektrometriás detektálás során. A grafitoszlopokról a nagy polaritású komponensek nem elújlhatók, míg a jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható HILIC kolonnákon a szulfatlatlan diszacharidoknak nincs kellő visszatartása. A méretkizárásos módszerek hátránya a mérések hossza mellett, hogy a detektálás érzékenysége alacsony, azonban a hialuronán-láncok emésztése során keletkező oligoszacharidok elválasztására jelenleg ez az egyetlen alkalmazható eljárás.

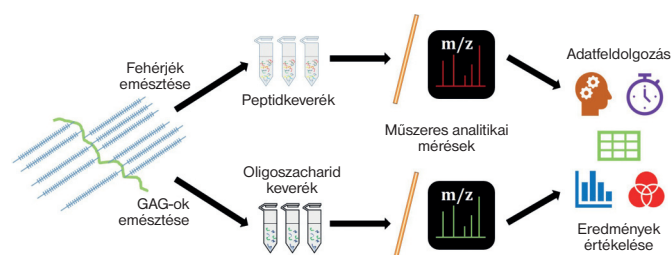
Kutatócsoportunkban nemrégiben kifejlesztésre került egy kromatográfiás módszer, amelynek segítségével kiküszöbölhetővé váltak a fent említett hátrányok. Kombinált retenciós mechanizmusú HILIC és gyenge anioncserés kölcsönhatásokon alapuló töltetet alkalmazva egy egyszerű, izokratikus kromatográfiás módszer alkalmazásával akár 10 fmol diszacharid kimutatása is lehetővé vált saját töltésű kapilláris oszlopokon.

A kromatográfiás módszerek mellett jelen vannak a kapilláris elektroforézisen alapuló módszerek is, azonban a szükséges érzékenység miatt kizárólag a lézerindukált fluoreszcencián alapuló detektálás (CE-LIF) alkalmazható megfelelően a célvegyületek biológiai mintákban való meghatározására.

Általánosan kijelenthető, hogy a GAG-ok kémiaiailag labilisak és kiemelkedően változatos szerkezetűek, így az elválasztásukat követő tömegspektrometriás analízisük számos nehézséget tartogat, azonban kizárólag MS alkalmazásával érhető el a biológiai minták vizsgálatához szükséges kimutatási határok. A vizsgálatok során kiemelten nagy ionizációs módszerek és speciális tandem tömegspektrometriás beállítások alkalmazása szükséges a teljes körű szerkezeti információ kinyeréséhez. Az enzimatis emésztés során keletkező, különböző mértékben szulfatált diszacharidok arányának meghatározása fontos lépés lehet a különböző betegségekhez vezető mechanizmusok megértéséhez.

A fent részletezett módszerekkel végzett általános munkafolyamatot a **2. ábra** írja le.

2. ábra. A proteoglikánok tömegspektrometriás vizsgálatának általános folyamatábrája





Összefoglalva elmondható, hogy a proteoglikánok az élő szervezet fontos építőelemei, de egyelőre csak kevésé ismertek. Szerkeztvizsgálatuk, műszeres analitikájuk elsősorban tömegspektrometrián alapul. Analízisük speciális mintaelőkészítést és komplex mérési technikát igényel, melyek még ma is fejlesztés alatt állnak. A most kidolgozás alatt álló analitikai módszerek ígéretesek, reményeink szerint akár néhány éven belül sokkal többet tudhatunk meg erről a fontos vegyületcsoportról. A cikk témáját képező ismeretanyag néhány jelentős közleményét az irodalomban jegyzékben listáztuk.



IRODALOM

[1] J. D. Esko, K. Kimata, U. Lindahl, Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans, Essentials of Glycobiology (2. kiadás), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2009.
 [2] L. Hu, M. Ye, X. Jiang, S. Feng, H. Zou, Anal. Chim. Acta. (2007) 598, 193.
 [3] N. Perrimon, M. Bernfield, Nature (2000) 404, 725.
 [4] J. Zaia, Mass Spectrom. Rev. (2004) 3, 161.
 [5] J. Zaia, OMICS, (2010) 14, 401.
 [6] V.L. Gill, U. Aich, S. Rao, C. Pohl, J. Zaia, Anal. Chem. (2013) 85, 1138.
 [7] L. Turiák, G. Tóth, O. Ozohanics, A. Révész, A. Ács, K. Vékey, J. Zaia, L. Drahos, J. Chrom. A. (2018) 1544, 41.
 [8] L. Turiák, O. Ozohanics, G. Tóth, A. Ács, A. Révész, K. Vékey, A. Telekes, L. Drahos, J. Prot. (2019) 197, 82.

Bruckner-termi előadás

Csávás Magdolna

DE Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerészi Kémiai Tanszék

Multivalens szénhidrátok szintézise és bakteriális lektinokkal való kölcsönhatásának vizsgálata

A lektinek szénhidrátkötő fehérjék, amelyek számos immunfolyamatban részt vesznek, szerepük van a sejtek agglutinációjában, továbbá fontos virulencia-faktorok [1]. Oligovalens, reverzibilis kötődésű szénhidrát-specifikus, kulcsszerepük van a bakteriális fertőzések kritikus lépésében, amely a gazdasejt felületéhez való adhéziós folyamatban fejeződik ki. Az antibiotikumok kezelése alternatívjaként a bakteriális lektinok célzó antiadhéziós terápia az első frontvonal lehet a patogénnel szemben, hiszen a mikroorganizmus multivalens glikoklaszterekhez kötődve nem képes a szervezetben lehorgonyozni. Kutatásaink során többértékű glikoklaszterek szintézisét valósítottuk meg, vizsgáltuk a fehérje-szénhidrát kölcsönhatás tulajdonságait, a multivalencia szerepét, az antiadhéziós terápia alkalmazásának lehetőségét. A baktérium és a gazdasejt közötti kommunikációért, az adhézió kialakulásáért felelős sejtfelszíni lektinek szénhidrátkötő helyeit a lektin specificitásának megfelelő szénhidrátokkal kívánjuk telíteni, a kölcsönhatás mértékének megsokszorozódását multivalens hatástól reméljük. Célunk Gram-negatív bakteriális lektinek dendron-típusú, multivalens szénhidrát-ligandumainak szintézise antiadhéziós terápia céljából, lektin-szénhidrát kölcsönhatások vizsgálata, biofilmképzés gátlása.

Multivalens fukozidok és galaktozidok szintézise és kölcsönhatásuk lektinokkal

A multivalens glikoklasztereket metil-gallát- és pentaeritrit-vázra építettük fel, etilén- és tetraetilén-glikol oldalláncokat alkalmazva hídmolekulaként. A szintézist azid-alkin click-reakcióval valósítottuk meg, a hordozókra az α -L-fukopiranoz és β -D-galaktopiranoz propargil glikozidját kapcsolva. A tri- és tetraavalens fukozidok [2] (1, 3 és 2, 4), valamint tri- és tetraavalens galaktozidok (5, 7 és 6, 8) potenciális több-

értékű ligandumai fukoz- és galaktóz-specifikus bakteriális lektinoknak (1. ábra).

Az agglutináció inhibíciójának mérésével jellemezhető a lektin-szénhidrát kölcsönhatás (1. táblázat), amelyből kiderült, hogy a tetraetilén-glikol láncot tartalmazó trivalens fukozid (4) ígéretes vezérvagyület számos fukoz-specifikus lektin esetén (1. táblázat, 3., 4., 5. és 7. sora), hiszen akár három nagyságrenddel jobb potenciált mutat, mint a lektinek természetes liganduma, az L-fukoz. Galaktozidok esetén is az analóg szerkezetű 8-as tetraavalens származék bizonyult a *P. aeur-*

1. ábra. Multivalens fukozidok (1, 2, 3, 4) és galaktozidok (5, 6, 7, 8) szerkezete

