

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Következő Generációs Analitikai Glikomika: Automatizálható Biomarker Kutatás

Készítette: Váradi Csaba

Témavezető: Prof. Dr. Guttman András



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2015

Következő Generációs Analitikai Glikomika: Automatizálható Biomarker Kutatás

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében az Elméleti Orvostudományok tudományágban.

Írta: Váradi Csaba okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája (Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Guttman András, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

tagok: Dr. Kerékgyártó János, kandidátus

Dr. Sipeki Szabolcs, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, 2015
12. 16. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Szökő Éva, az MTA doktora

Dr. Gáspár Attila, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Szökő Éva, az MTA doktora

Dr. Gáspár Attila, PhD

Dr. Kerékgyártó János, kandidátus

Dr. Sipeki Szabolcs, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet tanterme, 2015 12.16. 13 óra

1. Bevezetés

A szénhidrátok közismert funkciója az energiaháztartásban betöltött központi szerepük, bár az elmúlt években előtérbe került a fehérjék poszt-transzlációs módosításaként ellátott funkciójuk is. A glikoziláció az a folyamat, mely során egy vagy több szénhidrát egység kapcsolódik a fehérjékhez, a kapcsolt szénhidrát egységek a glikánok. A glikoziláció egy alapvető kémiai módosítása a fehérjéknek ami fontos szerepet játszik azok fizikai, kémiai és funkcionális tulajdonságaiban. A csatolt glikánok monoszacharid egységekből állnak melyek számos módon kapcsolódhatnak egymáshoz a kötés típusa és pozíciója alapján. A glikobiológia alapvető aspektusa, hogy szerkezeti információt szolgáltatson a fehérjékhez kapcsolt szénhidrátokról, és felfedje ezek biológiai folyamatokban betöltött szerepét. A csatolt glikánok funkciói nagyon változók lehetnek és általában két fő csoportra oszthatók.

1. Intrinsic funkciók
 - a. Struktúrális komponensei a sejtfalnak és extracelluláris mátrixnak
 - b. Módosítják a fehérjék oldékonyságát és stabilitását
2. Extrinsic funkciók lektin-glikán interakciók révén
 - a. Sejt-sejt, sejt-mátrix interakciók közvetítése
 - b. Glikokonjugátumok intra- és extracelluláris szállítása
 - c. Intra- és extracelluláris szignalizáció

A glikozilációnak két fő típusa van a glikán és a fehérje közötti kötéstől függően. Az N-glikánok nitrogénen keresztül kapcsolódnak általában aszparaginhoz, míg az O-glikánok egy oxigén atomon keresztül szerinhez vagy treoninhez. Az O-glikánok általában kisebbek, mindössze néhány monosacharid egységből állnak, míg az N-glikánok inkább komplex struktúrák számos antennával, sok esetben negatív töltésű szíalsavval végződve. Mindkét típusú glikoziláció megtalálható membránfehérjéken illetve különböző testfolyadékokba szekretált glikoproteineken. Az O-glikánok emésztésére specifikus enzim hiánya miatt, az N-glikoziláció szélesebb körben kutatott terület, ennek ellenére biológiai fontosságuk azonosnak tekintendő. Mindkét típusú glikoziláció esszenciális a fehérjék megfelelő foldingjához, stabilitásához és végrehajtó funkcióihoz. A fehérjék polipeptid szekvenciája közvetlenül kódolt a genomban, míg a glikán struktúrák monosacharid- és kötés-specifikus glikozil-transzferázok által épülnek fel,

ezáltal másodlagos géntermékeknek tekinthetők. Bár az eredetük nem templát-vezérelt, az enzimek struktúrája, melyek felelősek a glikánok szerkezeti felépítéséért kódolva vannak a genomban. Ezt először egérkísérletekben sikerült bebizonyítani, ahol arra is fény derült, hogy a glikokonjugátumok eliminációja betegségek kialakulásához vezethet. A glikokonjugátumok szénhidrát-tartalma változó, mint ahogy a glikozilációs kapcsolódási pontok és ezek lefedettsége is különbözhet fehérjéről fehérjére. Ez az antitestek esetében például viszonylag alacsony (kevesebb mint 5%-a a molekulatömegnek), míg más glikoproteinek esetében egészen magas is lehet mint a haptoglobin (19%), erythropoietin (40%), α 1-savas glikoprotein (45%), mucinok (40-80%). A glikoproteineknek több glikozilációs pontjuk is lehet egyszerre, melyeken különböző struktúrájú glikánok lehetnek, kapcsolódási pont-specifikus struktúrális diverzitást eredményezve, amit a fehérje glikoziláció mikroheterogenitásának nevezünk. A glikánok struktúrális heterogenitása a glikozidázok és glikozil-transzferázok expressziós szintjének függvénye, ami különböző patológiás körülmények között változhat. A glikozilációs változások érzékeny indikátorai lehetnek a sejtekben zajló biokémiai folyamatoknak ezáltal a glikoziláció analízis egy új utat nyithat a biomarker kutatás területén. Hatékony szénhidrát-specifikus markerek segítségével, a különböző betegségek korábban felismerhetőek lehetnek, megóvva ezzel a pácienseket a sokszor komplikált diagnosztikai eljárásoktól. A glikoziláció klinikai fontosságának felismerése fontos szerepet játszott a glikomika jelenleg is zajló aranykorának kialakulásában.

2. Célok

Az elmúlt évek egyik glikomikai szempontból legintenzívebben vizsgált glikoproteinje a haptoglobin és ennek glikán elváltozásai különböző tüdőbetegségekben. Kutatásunk első célja a haptoglobin glikánjainak teljeskörű szerkezeti feltérképezése volt illetve azok változásainak vizsgálata normál, akut gyulladásos, krónikus gyulladásos és daganatos tüdőbetegségekben, különös tekintettel a glikánok méretére és fukóz tartalmára.

Egy másik széles körben vizsgált potenciális biomarker az immunglobulin G glikozilációja melynek változásai kapcsolatba hozhatók az öregedéssel, terhességgel, gyulladásos és daganatos betegségekkel. Az egyik leggyakoribb IgG glikoziláció változás a csökkent terminális galaktoziláció gyulladásos betegségekben mint például Rheumathoid arthritis (RA) és Chron betegség (CD). Egyik legfontosabb célunk az volt, hogy megvizsgáljuk hasznosítható-e az IgG glikoziláció, mint biomarker egy gyulladásos betegség kezelése során és segítségével elkülöníthetők lesznek-e a jó illetve rossz válaszadó képességgel rendelkező páciensek. Azt vártuk, hogy a bizonyítottan csökkent IgG galaktoziláció RA-ben és CD-ben visszaáll az eredeti normál szintre, korrelálva a betegek válaszadó státuszával.

Az egyre növekvő gliko-biomarker kutatás és a terápiás antitestek hatalmas piaca miatt nagy szükség van automatizálható, nagy mintaszámot viszonylag gyorsan analizálni tudó eljárásokra melyek ugyanakkor megbízható és precíz adatot szolgáltatnak. Jelenleg a glikoziláció vizsgálatára használt eljárások során a mintapreparálás rendszerint napokig tart ugyanakkor drága és nehezen automatizálható laboratóriumi eszközöket igényelnek. Kísérleteink során egy olyan eljárás kifejlesztése volt a cél, mely segítségével nincs szükség többnapos mintapreparálásra és minden lépés könnyedén robotizálható, lehetővé téve ezzel egy automatizálható glikánpreparálást a biomarker kutatás és a gyógyszerfejlesztés számára.

3. Anyagok és Módszerek

3.1 Vegyszerek

Nagy tisztaságú HPLC víz, acetonitril, haptoglobin, dithiothreitol, jodoacetamid, ecetsav, és minden más vegyszer a Sigma Aldrich kft-től (St. Louis, MO, USA) származtak. 8-aminopirén-1,3,6-trisulfonát (APTS), Agencourt Cleanseq mágneses gyöngyöket a SCIEX szolgáltatotta (Brea, CA, USA). N-glikán standard glikánstruktúrák és a CU tisztító töltetek a Prozyme (Hayward, CA, USA) bocsátotta rendelkezésünkre. 96-os Protein A lemezeket a Thermo–Fisher-től (Waltham, MA, USA) a PNGáz F deglikozilációs kitet a New England Biolabs-tól (Ipswich, MA, USA) rendeltük.

3.2 Haptoglobin tisztítása plazma mintákból

A plazma minták gyűjtése, kontroll (2 férfi, átlagéletkor 61), pneumonia (3 férfi, átlagéletkor 60), COPD (3 férfi, átlagéletkor 61), és tüdőrákos (3 férfi átlagéletkor 61.3) páciensektől a Debreceni Egyetem Tüdőgyógyászati tanszékén zajlott a RKEB /IKEB:2422-2005 protokoll alapján. A tanulmány a Magyar Kutatásetikai Bizottság és a páciensek írásos beleegyezésével egyaránt jóvá lett hagyva. Minden egyes páciensből származó plazmából 200 μ L, 1000 μ L-re lett hígítva 50 mM-os kálium-hidrogén foszfát (pH 7.0) kötő pufferrel. A plazma minták humán szérum albumin tartalma 250 μ L Blue Sepharose 6 segítségével lett eltávolítva egy 30 perces szobahőmérsékleten történő inkubálás során. Ezt lecentrifugálva, az albumin mentesített átfolyó 250 μ L Protein G4-el (GE-Healthcare) volt inkubálva szintén 30 percig szobahőmérsékleten, a plazma IgG tartalmának megkötése céljából. Ezután, a humán szérum albumin és IgG mentesített plazma egy házilag készített anti-haptoglobin mAb affinitás oszlopra (1 mL térfogat) lett töltve majd egy órán keresztül inkubálódott szobahőmérsékleten. A megkötés után az oszlop 7 mL foszfát pufferrel (pH 7.2) lett átmosva majd a megkötött haptoglobin 2 x 1 ml 0.2 M glycine - HCl elúciós pufferrel lett leluálva (pH 2.7). A kinyert haptoglobin neutralizációja 0.2 mL 1 M Tris-HCl (pH 9) pufferrel történt. A fehérjekoncentráció bicinchoninsav (BCA) kit révén került meghatározásra a forgalmazó által szolgáltatott protokoll szerint (Pierce, Rockford, IL, USA). Az affinitás-kromatográfia során megkötött haptoglobin molekulák tisztaságáról 4-20 % Tris-Glycin grádiens gél szolgáltatott információt

3.3 Haptoglobin minták PNGáz F emésztése

Az előállított haptoglobin mintákról (50 µg/páciens), redukálást (50 mM dithiothreitol 65°C 30 perc) és alkilálást (50 mM jodoacetamid 37°C 60 perc) követően, 50 µL nátrium-bikarbonát és 2 unit rekombináns PNGáz F (Prozyme) hozzáadásával történt meg az N-glikánok leemésztése egy 16 órás 37°C-os inkubálás során. A szabad glikán struktúrák 10 kDa (Nanosep, Sigma-Aldrich) spinfilterek segítségével lettek elválasztva a fehérjétől melyet vákumcentrifugás beszárítás követett. A glikánok fluoreszcens jelölése egy redukzív aminálási lépésben történt 5.5 µL 20 mM-os APTS és 1.5 µL of 1 M nátrium-cianoborohidrid oldat hozzáadásával 37 °C-on 16 órán keresztül. A reakció megállítása 93 µL HPLC tisztaságú víz hozzáadásával történt melyet normál fázisú (PhyNexus, San Jose, CA, USA) tisztítás követett a minták szabad festék és sótartalmának eltávolítása céljából.

3.4 RA és CD páciensek mintái

A tanulmány és a minták levétele Debreceni Egyetem Etikai Felügyelőbizottsága és a Helsinkii deklaráció által jóváhagyott protokoll szerint zajlott. Minden egyes páciens írásos beleegyezésével járult hozzá a minták levételéhez és felhasználásához. Az RA páciensek maximum tolerálható methotrexát kezelést kaptak (5-30 mg hetente), aminek stabilnak kellett lennie legalább 4 héttel a minták levétele előtt. Prednizon terápia (≤ 10 mg naponta) minden CD páciensnek megengedett volt aminek stabilnak kellett lennie legalább 8 héttel az infliximab terápia előtt.

3.5 IgG glikánok preparálása

50 µL szérum minta lett 250 µL foszfát pufferrel (pH 7) kihigitva majd a minták egy 96-os Protein A lemezre töltve melyet egy mosási lépés követett 300 µL foszfát puffer révén. A Protein A által megkötött fehérjék elúciója 200 µL 10 %-os ecetsavval történt amit 10 kDa-os spinfilterek által kivitelezett puffercsere követett 50 µL 50 mM ammónium-bikarbonátra. PNGáz F emésztésre Prozyme deglikozilációs kit volt használva a gyártó által javasolt protokoll szerint. A leemésztett glikánok beszárítása vákum-centrifugában történt amit fluoreszcens jelölés követett 6 µL (20 mM APTS 15 % ecetsavban) és 2 µL 1 M nátrium-cianoborohidrid segítségével (37°C 16 óra). A jelölt glikánok Prozyme CU töltetek révén lettek megtisztítva.

3.6 Kapilláris elektroforézis

Az APTS-jelölt glikánok vizsgálata egy fluoreszcens detektorral (excitáció: 488 nm, emisszió: 520 nm). felszerelt SCIEX PA800 plus kapilláris elektroforézis rendszer segítségével történt. Az elválasztások egy 50 cm effektív, 60 cm teljes hosszúságú N-CHO bevont falú 50 µm átmérőjű kapillárisban történtek egy N-CHO, a szénhidrátok elválasztására kifejlesztett pufferrel (SCIEX). Az alkalmazott feszültség 500 V/cm volt, katódos injektálással és anódos detektálással. A minták injektálása nyomással történt, 1 psi (6.89 kPa) 5 másodperc időtartammal. APTS jelölt maltózt használtunk belső standardként minden egyes mintához. Az adatok kiértékelésére Karat 32 7.0 verziója szolgált.

3.7. Génexpressziós analízis

A génexpressziós adatok globális transzkriptomikai analízisből származtak. A microarray adatok elérhetőek Gene Expression Omnibus adatbázisban (GSE42296).

3.8. Statisztikai analízis

A Mann-Whitney összehasonlítások IBM SPSS 20 szoftverrel (New York, US) készültek. A 0.05-nél kisebb p értékek voltak szignifikánsnak tekintve.

4. Eredmények

4.1. Megnövekedett elágazási- és fukozilációs fok a haptoglobin N-glikánjain gyulladássos és daganatos tüdőbetegségekben

Az albumin és IgG eltávolítása után a plazma mintákból affinitás-kromatográfia révén nyertük ki a haptoglobin molekulákat. A megkötött glikoproteinek tisztasága SDS-PAGE-n volt leellenőrizve. Az N-glikánok preparálása, PNGáz F emésztés, APTS jelölés, normál fázisú tisztítás sorrendben zajlott amit a kapilláris elektroforézis analízis követett. A deszialilált glikán struktúrák relatív eloszlását alapul véve, a fukozilációs és elágazási fokok minden egyes csoportban meghatározásra kerültek (kontroll, pneumonia, COPD, tüdőrák), elkülönítve a α 1-6 core- és α 1-3 kötődésű arm-fukozilációs fokokat.

4.1.1. Glikánok elágazási fokának változása

A szérum glikoproteinek megnövekedett glikozilációs elágazási foka egy alapvető változásnak tekinthető a különböző betegségekben. Jelen tanulmányban első célunk volt az elágazási fok meghatározása haptoglobin glikánjain, összehasonlítva a kontroll, pneumonia, COPD és tüdőrák csoportokat. Az összehasonlítás az 1. Egyenlet alapján zajlott ami megmutatja, hogy a teljes glikán mennyiség hány százaléka magasabb elágazási fokú (3, 4 antennás) glikán.

Elágazási fok = Három+négy-antennás glikánok mennyisége / Teljes glikán mennyiség **Egyenlet 1.**

Megnövekedett elágazási fok volt kimutatható minhárom betegségcsoportban, ahol a COPD csoport mutatta a legkiemelkedőbb változást. Enek háttérében az A2G2 glikán arány nagy mértékű csökkenése és az A3G3 struktúra relatív növekedése állt.

4.1.2. Fukozilációs fok

A humán haptoglobinon előforduló kétféle fukozilációs típus a α 1-6 core- és α 1-3 kötődésű arm-fukoziláció. A core-fukoziláció esetében a fukóz a glikán struktúra legelső N-acetil-glükózamin (GlcNAc) egységéhez kapcsolódik α 1-6-os kötéssel míg az arm-fukozilációnál a fukóz egy a karon levő GlcNAc-hez kapcsolódik α 1-3/4-os kötés révén. A fukozilációs fok a 2. Egyenlet

alapján került meghatározásra mely megmutatja a fukozilált glikánok százalékos arányát a teljes glikánmennyiséghez képest.

Fukozilációs fok=Fukozilált glikánok mennyisége/Teljes glikánmennyiség **Egyenlet 2.**

A fukozilációs fok kis mértékű csökkenést mutatott pneumoniában és COPD-ben míg tüdőrákban szignifikánsan magasabb értékek voltak megfigyelhetőek. Elkülönítve a core- és arm-fukozilációt az is kimutatható volt, hogy a pneumoniában és COPD-ben megfigyelt alacsonyabb fukoziláció, a core-arm-fukoziláció fluktuációjának volt köszönhető ami azt jelenti, hogy a csökkent arm- és a megnövekedett core-fukoziláció miatt minimális különbség mutatkozott a teljes fukozilációs-fok meghatározásánál. Ez a megfigyelés azt sugallja, hogy rendkívül fontos a különböző típusú fukozilációs fokok elkülönített meghatározása mivel előfordulhat, hogy nem mutatható ki különbség a teljes fukozilációban minthogy a két típusú fukoziláció kioltja egymást. Fontos azt is megjegyezni, hogy a fukozilációs fok legnagyobb mértékű növekedése tüdőrákban volt kimutatható aminek a hátterében az arm-fukoziláció szignifikáns emelkedése állt.

4.2. IgG glikoziláció gyulladássos betegségekben anti-TNF α hatására

Ennek a tanulmánynak a célja az volt, hogy megvizsgáljuk az IgG glikánok változásait Crohn betegségben és Rheumathoid arthritisben anti-TNF α kezelés előtt és után. Az IgG molekulák izolálása a szérumbintákból Protein A affinitáskromatográfia segítségével történt amit a glikánok enzimatis emésztése követett PNGáz F enzimmel. Ezt a cukorszerkezetek fluoreszcens jelölése, majd a kapilláris elektroforézis analízis (CE-LIF) követte. Kihhasználva a CE-LIF rendkívül nagy érzékenységét, 26 IgG glikoform kvantifikálására került sor minden egyes páciens esetében a kezelés előtt és után.

4.2.1. IgG glikoziláció RA-ben anti-TNF α kezelés előtt és után

RA-ben speciális teszt került kifejlesztésre a betegek állapotának kiértékelése és a válaszadókészség meghatározása céljából. Ez a DAS28 (disease activity score examining 28 joints, which are commonly affected by RA), ami a beteg 28 ízületét vizsgálja kombinálva a C reaktív protein (CRP) szintjével. Minthogy ez egy hosszadalmas és körülményes procedúra, egyértelmű szükség van egy olyan gyors, kevésbé komplikált eljárásra amivel könnyedén

monitorozni lehet a beteg állapotát és elkülöníteni a különböző kezelésekre különböző fogékonysággal rendelkező pácienseket. 17 RA páciens közül 6 (5 nő, 1 férfi, átlagéletkor 44.3 év) lett válaszadóként (R) illetve 11 (9 nő, 2 férfi, átlagéletkor 47 év) nem-válaszóként (NR) azonosítva a DAS28 alapján. A glikozilációs analízis során 3 struktúra, A2(3)G1, A2B(3)G1 és FA2B(3)G1 volt szignifikánsan különböző az R és NR csoport között a kezelés előtt. Ezen struktúrák mindegyike galaktozilált és minden egyes esetben a válaszadók mutattak magasabb értékeket. Összehasonlítva a kezelés előtti és utáni értékeket nem volt szignifikáns változás megfigyelhető RA-ben, fontos viszont megjegyezni, hogy mindkét csoportban (R, NR) nőtt a galaktozilált glikánok aránya. Ezek az eredmények megegyeznek más tanulmányokkal, ahol ugyancsak leírásra kerültek az IgG glikánok galaktozilációs változásai RA-ban viszont ezek biológiai markerként való hasznosítása meghiúsult a biológiai terápiák után. A kimutatott glikozilációs különbségek hátterének megértése érdekében a megfelelő glikozidázok és glikozil-transzferázok expressziós szintjei ugyancsak megvizsgálásra kerültek, melyek alátámasztották a glikozilációs adatokat, minthogy nem volt szignifikáns változás a kezelés hatására. Egy kiemelkedő különbség volt kimutatható a R és NR csoport között kezelés előtt ami a magasab galaktozidás aktivitás az NR csoportban. Ez alátámasztja a CE-LIF-el talált alacsonyabb galaktozilációs értékeket a nem válaszadóknál.

4.2.2. IgG glikoziláció Crohn betegségben anti-TNF α kezelés előtt és után

Crohn betegségben (CD) különböző diagnosztikai paraméterek kombinációja révén határozzák meg a betegség súlyosságát, esetleges javulását. Ezek a hasmenések száma, hasi fájdalom, általános közérzet, testsúly, hematokrit érték, hasmenés elleni szerek szükségessége illetve extraintesztinális szövődmények együttesen adják a Crohn's Disease Activity Indexet (CDAI). A CDAI alapján 14 páciens lett válaszadóként (6 nő, 8 férfi, átlagéletkor 36.2 év) illetve 5 nem-válaszóként (3 nő, 2 férfi, átlagéletkor 36 év) azonosítva. A szérumból két héttel a kezelés előtt és után kerültek levételre, bár a válaszadókésztség azonosítása csak hónapokkal később volt lehetséges. Hasonlóan az RA-ban talált megfigyelésekhez, már a kezelés előtt is szignifikáns IgG glikozilációs különbségek voltak kimutathatók az R illetve NR csoport között. Mann-Whitney párosított összehasonlítást használva, a A2G2S1, FA2BG2S1, FA2(3)G1 és az FA2BG2 struktúrák voltak szignifikánsan különbözőek a biológiai terápia előtt. Ezek alapján jól kivehető, hogy az NR csoport szignifikánsan alacsonyabb galaktozilációs szinttel rendelkezett a kezelés

előtt, ami utalhat az ezekben a páciensekben megváltozott galaktozidáz/galaktozil-transzferáz arányra. Ellentétben RA-val viszont CD-ben nem voltak szignifikáns különbségek kimutathatók a megfelelő enzimek expressziós szintjében a kezelést megelőzően.

A legfontosabb célja ennek a tanulmánynak, egy olyan glikozilációs marker kimutatása volt, ami alapján azonosíthatóak a kezelésre jó reagáló válaszadó páciensek. Ellentétben az RA eredményekkel, CD-ben kimutatható volt szignifikáns változás a kezelést követően. A válaszadók csoportjában az FA2G2S1 glikán aránya szignifikánsan magasabb volt a kezelés után, amit a transzkriptomikai adatok is alátámasztottak minthogy magasabb szialil-transzferáz illetve alacsonyabb szialidáz aktivitás volt detektálható a válaszadó CD páciensekben. Ezek az eredmények összefüggésben vannak korábbi publikációkkal, ahol leírták a terminális szialsavval rendelkező glikánok fontosságát az IgG anti-inflammatorikus hatásainak kifejtésében.

4.3. Mágneses gyöngy alapú glikánpreparálási eljárás kifejlesztése

Ezen kutatás célja gyors és automatizálható eljárás kifejlesztése volt ami lehetővé teszi akár nagy mintaszám gyors preparálását. Különös figyelmet fordítottunk arra, hogy ne legyen szükség drága és nehezen automatizálható eszközökre mint például az eddigi protokollokhoz nélkülözhetetlen vákumcentrifuga illetve, hogy felgyorsítsuk a hosszú 16 órás inkubálásokat. A DNS és proteomikai technikákban már korábban sikerrel hasznosított mágneses gyöngy technológia tette lehetővé a centrifugálási lépések nélkülözhetőségét. A protokoll kifejlesztése, magas mannóztartalmú, komplex glikánokkal rendelkező illetve erősen szialsavas modellfehérjéken történt. Minden egyes lépés, beleértve a PNGáz F emésztés, APTS jelölés illetve tisztítás külön-külön lett optimalizálva, kifejlesztve egy teljesen új eljárást, mely nagy mértékben lecsökkenti a mintapreparáláshoz szükséges időt.

4.3.1. PNGáz F emésztés

Ebben a lépésben a deglikozilációhoz szükséges 16 órás inkubációs idő lerövidítése volt a cél úgy, hogy közben a PNGáz F emésztés hatékonysága megmaradjon. Számos lehetőség adott a glikánok felszabadításának felgyorsítására mint például a nagyobb enzimkoncentráció, mikrohullámú besugárzás, magasabb hőmérséklet. Figyelembe véve, hogy az alapvető cél egy

egyszerű többsatornás pipettázó robot által kivitelezhető eljárás kifejlesztése volt, a magasabb hőmérsékleten történő deglikozilációt részesítettük előnyben.

A PNGáz F hatékonysága 37 és 50 °C-on lett összehasonlítva, IgG, fetuin és ribonukleáz B fehérjéken 0.5, 1, 2, 4, 8 és 16 órás inkubációs időket használva, hogy megtaláljuk a leggyorsabb már teljes deglikozilációt eredményező stratégiát. A felszabadított glikánok, APTS jelölése után CE-LIF analízis következett. Minden egyes emésztési stratégiánál 3 párhuzamos minta lett preparálva és minden egyes preparátum háromszor lett profilozva, 9 adatpontot eredményezve az egyes emésztésekhez. Míg az egyes fehérjékhez tartozó glikáncsúcsok relatív eloszlása nem mutatott különbséget az egyes emésztési stratégiák között, addig az csúcsok intenzitása meglehetősen eltért, utalva az leemésztett glikánmennyiségek különbözőségeire. Növelve az inkubációs időt a csúcsintenzitások lassan növekedtek 37°C-on, míg 50°C-on már egy óra után elérték a maximumot. Ez alapján arra a következtetésre került sor, hogy a magasabb hőmérséklet valóban felgyorsítja a deglikozilációt, így az 1 óra/50°C PNGáz F emésztés lett kiválasztva az automatizálható protokoll első lépéseként.

4.3.2. APTS jelölés

A jelölés optimalizálásánál az volt a cél, hogy olyan körülményeket teremtsünk melyek lehetővé teszik a mágneses gyöngy alapú technológiát, tehát nincs szükség semmiféle centrifugálási lépésre, illetve, hogy hasonlóan a PNGáz F emésztéshez lerövidítsük az eredeti 16 órás inkubációs időt, ugyanakkor a jelölés hatékonysága ne maradjon el az eredetitől. Elsőként, mono- és diszialilált glikánstandardok (A2G2S1, FA2G2S1, A2G2S2, FA2G2S2) lettek jelölve 20 mM APTS 15% ecetsav oldattal, 2 órán keresztül 37, 50, 65 és 80 Celsius fokon inkubálva. A kiválasztott glikánstruktúrák nem szialsavas párijai (A2G2, FA2G2) ugyancsak jelölésre kerültek, a szialilált struktúrák esetleges deszializációjának könnyebb detektálása érdekében. Az eredmények kiértékelése során egyértelműen kimutatható volt a hőmérséklet emelésével arányosan fokozódó deszializáció mely átlagosan 2% volt 50, 11% 65, és 33% 80°C-n. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a hőmérséklet emelése kritikus a szialsavvesztés szempontjából így a 37°C-os inkubáció lett kiválasztva további kísérletek kivitelezésére. Ezt követte, az inkubációs idő hatásának vizsgálata a jelölési hatékonyságra. A tervezett protokollban mindenképp a 2 óránál hosszabb inkubációs idő elkerülése volt a cél ezért a 2 óra 37°C-os inkubáció került összehasonlításra az eredeti protokollal (37°C 16 óra). Hasonlóan a magasabb inkubálási

hőmérsékletnél tapasztaltaknál, a hosszabb inkubáció is deszializációban nyilvánult meg. A monoszialilált 2-3%, míg a diszialilált struktúrák átlagosan 9-10% szialsavat veszítettek kimutatva, hogy az inkubációs idő hossza hasonlóan fontos az inkubálás hőmérsékletéhez. Fontos megjegyezni, hogy míg a hosszabb inkubáció deszializációt okozott, a 2 órás esetén szignifikánsan alacsonyabb csúcsintenzitás volt megfigyelhető. Mivel egy preparálás során sokkal fontosabb, az intakt minta megőrzése mint a jelintenzitás, így a 2 óra 37°C-os inkubáció lett kiválasztva a további kísérletekhez.

Az alacsonyabb jelintenzitás kiküszöbölésére, megvizsgáltuk a jelölésre használt oldatban levő komponensek hatását (APTS koncentráció, ecetsav%) a jelölési hatékonyságra. Elsőként az eredeti protokollban is használt 20 mM-os APTS oldatot 15% ecetsavban hasonlítottuk magasabb 20 és 25 százalékos ecetsav koncentrációkhoz. Az előző kísérletekben már sikeresen használt glikánstruktúrákat (A2G2S1, FA2G2S1, A2G2S2, FA2G2S2) használtuk standardként a jelölési hatékonyság vizsgálatára illetve az esetleges szialsav veszteség kimutatására. Kiemelkedően magasabb jelintenzitások voltak detektálhatóak a 20 illetve 25%-os ecetsav koncentrációk esetében, viszont a 20-25% közötti különbség minimális volt így a 20%-os ecetsav lett kiválasztva további kísérletek kivitelezésére. Az APTS koncentráció vizsgálata a jelölési hatékonyságra maltooligoszacharid létra használatával történt, mely során 20, 40, illetve 80 mM APTS oldatok lettek összehasonlítva 20%-os ecetsavban. Ahogy várható volt, a festék koncentrációjának emelése, magasabb jelölési hatékonyságot eredményezett ami a 80 mM-os esetében volt a legmagasabb. Fontos megjegyezni, hogy a jelölés általában 6-10 μ L jelölési oldat használatát jelenti, viszont a megbízható robotizált pipettázáshoz szükséges viszonylag nagyobb térfogatok használata (>20 μ L), így a 40 mM-os APTS koncentráció használata tűnt célszerűnek, mivel a jelölést követő tisztítás során el is kell távolítanunk a nem reagált festékmennyiséget. Ezután, az eredeti (20 mM APTS 15% ecetsav 37°C 16 óra) protokoll és az újonnan kifejlesztett (40 mM APTS 20% ecetsav 37°C 2 óra) eljárás összehasonlítása következett. Hasonlóan a korábbi eredményekhez, ismét az eredeti protokoll eredményezte a magasabb szignálintenzitást (>50%), viszont a magasabb ecetsav és festékkoncentráció 20 %-al ugyancsak magasabb jelet eredményezett a korábbi eredményekhez képest és ami a legfontosabb szialsav veszteség nélkül. Ezek után az újonnan optimalizált 2 órás protokoll került kiválasztásra a rapid automatizálható platform jelölési lépéseként.

4.3.3. Mágneses gyöngy alapú mintapreparálás

Ennek a tanulmánynak a kulcsa az inkubációs idők lerövidítése illetve a vákumcentrifuga mellőzése volt a preparálás során. Az utóbbi kiküszöbölésére karboxil-kötött mágneses gyöngyök szolgáltatták a megoldást, illetve annak felismerése, hogy mind a natív mind a jelölt glikánok interakcióba lépnek az gyöngyökkel, Ezáltal azok megkötése, mosása és elúciója lehetséges egyszerű pipettázási lépések segítségével így nincs szükség vákum-centrifugára. Először az APTS tisztítás optimalizálása történt a mágneses gyöngyök használatával. APTS jelölt IgG, fetuin és ribonukleáz B glikánok lettek megtisztítva (3 minta/fehérje) 200 μL karboxil-kötött mágneses gyöngyöt használva. A megkötő és mosó lépésekre 150 μL 87.5% acetonitril, míg az elúcióra 25 μL nagy tisztaságú HPLC vizet használtunk amit az eluátum CE-LIF analízise követett. Annak érdekében, hogy meggyőződjünk, minden glikán elúciója sikeresen megtörtént, második illetve harmadik elúciót is végeztünk. A CE-LIF analízis azt mutatta, hogy 25 μL HPLC víz sikeresen lemosta az összes megkötött glikánt a gyöngyökről, viszont kisebb elúciós térfogat esetén ez csak részleges volt. Fontos kiemelni, hogy a relatív csúcseloszlásban nem volt különbség a mágneses gyöngyöket használva tisztításként, összehasonlítva a korábban használt vákumcentrifugát is igénylő protokollal.

Miután az APTS tisztítás során sikeresen alkalmaztuk a mágneses gyöngyöket, ugyennek a stratégiának az alkalmazására került sor az emésztés után felszabadított glikánok megkötésére is. A PNGáz F emésztés inkubációját követően 200 μL mágneses gyöngy került hozzáadásra az emésztési oldathoz úgy, hogy 87.5 % legyen a végleges acetonitril koncentráció. Többszöri szuszpendálás után a gyöngyök által megkötött glikánokat 21 μL a már korábban optimalizált (40 mM in 20% acetic acid) jelölési oldat hozzáadásával eluáltuk. A jelölési reakció 7 μL 1 M pikolin-borán hozzáadásával lett elindítva. A 2 órás inkubációt követően a korábban már kifejlesztett mágneses gyöngyalapú tisztítást alkalmazva elkészült az CE-LIF analízisre kész preparált minta, bármiféle vákumcentrifuga és egész éjszakás inkubáció nélkül. Az optimalizált lépéseket összerakva 4 órára sikerült redukálni a glikánok preparációs idejét. További célunk a kifejlesztett eljárással, egy többcsatornás pipettorra történő integrálása és nagyobb mintaszámon történő kipróbálása.

5. Diskusszió

5.1. Haptoglobin N-glikozilációs változásai

Kutatásunk célja a haptoglobin glikánjainak teljeskörű szerkezeti feltérképezése volt illetve azok változásainak vizsgálata normál, akut gyulladásos, krónikus gyulladásos és daganatos páciensekben, különös tekintettel az elágazási és fukozilációs fokokra. Megnövekedett elágazási fok volt kimutatható minhárom betegségcsoportban, ahol a COPD csoport mutatta a legkiemelkedőbb változást. Ennek hátterében az A2G2 glikán arány nagy mértékű csökkenése és az A3G3 struktúra relatív növekedése állt. A fukozilációs fok kis mértékű csökkenést mutatott pneumoniában és COPD-ben, míg tüdőrákban szignifikánsan magasabb értékek voltak megfigyelhetőek. Elkülönítve a core- és arm-fukozilációt az is kimutatható volt, hogy a pneumoniában és COPD-ben megfigyelt alacsonyabb fukoziláció, a core-arm-fukoziláció fluktuációjának volt köszönhető ami azt jelenti, hogy a csökkent arm- és a megnövekedett core-fukoziláció miatt minimális különbség mutatkozott a teljes fukozilációs-fok meghatározásánál. Ez a megfigyelés azt sugallja, hogy rendkívül fontos a különböző típusú fukozilációs fokok elkülönített meghatározása mivel előfordulhat, hogy nem mutatható ki különbség a teljes fukozilációban mivel a két típusú fukoziláció kioltja egymást. Fontos azt is megjegyezni, hogy a fukozilációs fok legnagyobb mértékű növekedése tüdőrákban volt kimutatható, aminek a hátterében az arm-fukoziláció szignifikáns emelkedése állt.

5.2. IgG glikozilációs változások anti-TNF α hatására

Az egyik leggyakoribb IgG glikozilációs változás a csökkent terminális galaktoziláció gyulladásos betegségekben mint például Rheumathoid arthritis (RA) és Chron betegség (CD). Egyik legfontosabb célunk az volt, hogy megvizsgáljuk hasznosítható-e az IgG glikoziláció mint biomarker egy gyulladásos betegség kezelése során és segítségével elkülöníthetők lesznek-e a jó illetve rossz válaszadó képességgel rendelkező páciensek. Ellentétben az RA eredményekkel, CD-ben kimutatható volt szignifikáns változás 2 héttel a kezelés után. A válaszadók csoportjában az FA2G2S1 glikán aránya szignifikánsan magasabb volt a kezelés után, amit a transzkriptomikai adatok is alátámasztottak minthogy magasabb szialil-transzferáz illetve alacsonyabb szialidáz aktivitás volt kimutatható a válaszadó CD páciensekben. Ezek az eredmények összefüggésben

vannak korábbi publikációkkal ahol leírták a terminális szíálsavval rendelkező glikánok fontosságát az IgG anti-inflammatorikus hatásainak kifejtésében.

5.3. Mágneses gyöngy alapú mintapreparálás

Az egyre növekvő gliko-marker kutatás és a terápiás antitestek hatalmas piaca miatt nagy szükség van automatizálható, nagy mintaszámot viszonylag gyorsan analizálni tudó eljárásokra, melyek ugyanakkor megbízhatóak és precíz adatot szolgáltatnak. A jelenleg glikoziláció vizsgálatra használt eljárások során a mintapreparálás rendszerint napokig tart továbbá drága és nehezen automatizálható laboratóriumi eszközöket szükségeltetnek. Kísérleteink során egy olyan eljárást fejlesztettünk ki, mely segítségével nincs szükség többnapos mintapreparálásra és minden lépés könnyedén robotizálható, lehetővé téve ezzel egy automatizálható glikánpreparálást a biomarkerkutatás és a gyógyszerfejlesztés számára. Az eredeti közel 50 órás preparációs időt sikerült 4 órára redukálni továbbá nincs szükség vákumcentrifugációra, mely nagy mértékben megkönnyíti az eljárás automatizálhatóságát.

6. Összefoglalás

A glikoziláció biomarker potenciálja került bemutatásra ebben a tézisben, a haptoglobin és IgG glikoproteinekre fókuszálva. A haptoglobin glikozilációjának változásai már számos korábbi publikációban leírásra kerültek, mi viszont a glikánok elágazási és fukozilációs fokának változásaira fordítottunk kiemelt figyelmet. A talált eredmények megegyeznek a korábbi tanulmányokban leírtakkal minthogy emelkedett fukozilációs és elágazási fokot sikerült kimutatni a haptoglobin glikánjain a gyulladásos és daganatos tüdőbetegségekben.

A válaszadók azonosítása rendkívül fontos olyan hosszan tartó költséges kezelések esetén mint a biológiai terápiák. RA-ben és CD-ben a jelenlegi pontozós rendszerek segítségével hónapokba telik a válaszadók azonosítása. Az IgG glikoziláció köztudottan változik ezekben a betegségekben, mely magában hordozza a lehetőséget, hogy markerként hasznosítsuk. A CD páciensekben 2 héttel az anti-TNF α kezelés után sikerült kimutatni szignifikáns változást mely alapján megkülönböztethetők a válaszadók és nem-válaszadók. Ez az eredmény magában hordozza annak lehetőségét, hogy a jövőben az IgG glikozilációt esetleges biomarkerként használják ebben a betegségben.

A jelenlegi glikánpreparálási technológiákat több napos inkubálás, manuális pipettázás és a vákum-centrifuga nélkülözhetetlensége jellemzi. Erre jelenthet megoldást az általunk újonnan kifejlesztett mágneses gyöngy alapú mintapreparálási eljárás mely mindössze 4 óra alatt képes akár 96 mintát elkészíteni vákumcentrifuga szükségessége nélkül és teljes mértékben automatizálható. Ez nagy mértékben megkönnyítheti a kutatók dolgát a jövőben, mindamellett megnövelheti a kísérletek precizitását és reprodukálhatóságát.



Nyilvántartási szám: DEENK/98/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Váradi Csaba
Neptun kód: MH5HSS
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10037921

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Váradi, C.**, Holló, Z., Póliska, S., Nagy, L., Szekanecz, Z., Váncsa, A., Palatka, K., Guttman, A.:
Combination of IgG N-glycomics and corresponding transcriptomics data to identify anti-TNF α treatment responders in inflammatory diseases.
Electrophoresis. Epub ahead of print (2015)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201400575>
IF:3.161 (2013)
2. **Váradi, C.**, Lew, C., Guttman, A.: Rapid Magnetic Bead Based Sample Preparation for Automated and High Throughput N-Glycan Analysis of Therapeutic Antibodies.
Anal. Chem. 86 (12), 5682-5687, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ac501573g>
IF:5.825 (2013)
3. **Váradi, C.**, Mittermayr, S., Szekrényes, Á., Kádas, J., Takács, L., Kurucz, I., Guttman, A.: Analysis of Haptoglobin N-glycome Alterations in Inflammatory and Malignant Lung Diseases by Capillary Electrophoresis.
Electrophoresis. 34 (16), 2287-2294, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201300041>
IF:3.161





További Közlemények

4. Guttman, M., **Váradi, C.**, Lee, K.K., Guttman, A.: Comparative glycoprofiling of HIV gp120 immunogens by capillary electrophoresis and MALDI mass spectrometry.
Electrophoresis. Epub ahead of print (2015)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201500054>
IF:3.161 (2013)

5. Szekrényes, Á., Partyka, J., **Váradi, C.**, Krenkova, J., Foret, F., Guttman, A.: Sample preparation for N-glycosylation analysis of therapeutic monoclonal antibodies by electrophoresis.
In: *Microchip Capillary Electrophoresis Protocols : Methods in Molecular Biology*. Ann Van Schepdael, Springer protocols, Clifton, N. J, 183-195, 2015.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2353-3_16

6. Meskó, B., Póliska, S., Szamosi, S., Szekanez, Z., Podani, J., **Váradi, C.**, Guttman, A., Nagy, L.:
Peripheral blood gene expression and IgG glycosylation profiles as markers of tocilizumab treatment in rheumatoid arthritis.
J. Rheumatol. 39 (5), 916-928, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3899/jrheum.110961>
IF:3.258

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,566

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 12,147

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.04.29.

