

OTKA jelentés, 2010, március

Az elmúlt esztendőben kísérleteink olyan stádiumba jutottak, hogy eredményeinket nyilvánosságra hozhattuk. A publikációk nagy érdeklődést keltettek, több meghívást is kaptunk előadásokra. Tervezzük, hogy ezen a területen tovább dolgozunk.

#### *A részletes jelentés.*

1) Glikopeptideket dúsítottunk affinitás-kromatográfiával. Marha szérumot használtunk forrásként, és elsősorban O-glikozilált glikoproteinek jellemzésére fókuszáltunk. Az általunk használt lektin, Jacalin, a mucin-típusú glikoziláció 1 alapszerkezetéhez (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ ) mutat affinitást, amennyiben az nincs a 6-os pozícióban szubsztituálva. Így a módosított peptideken diszacharidokra vagy a lezáró szíalsavval együtt triszacharidokra számíthatunk. A dúsítási eljárás reprodukálható, viszont sajnálatos módon jelentős mennyiségű módosítatlan peptid is kötődik az oszlophoz. Ennek ellenére triptikus emésztés után kb. 150 glikopeptidet tudunk izolálni anélkül, hogy a szérum kb. 98%-át alkotó, többségükben nem O-glikozilált fehérjéket eltávolítanánk valamilyen módon az emésztés előtt.

A glikopeptid-elegyek hazai analízise zömében csak jelenlétüket tudta igazolni. Ennek az az oka, hogy a proteomikában általánosan használt tömegspektrometriás rendszerekben alkalmazott ütközéses aktiválás (CID) hatására a glikozidos kötés sokkal könnyebben hasad, mint a peptidkötés, így jobbára a módosító szénhidrátról sikerül csupán információt szereznünk. 2008 végétől mintáink analízisét a University of California San Francisco tömegspektrometriás laboratóriumában végeztük egy új fragmentációs technika, az elektron-transzfer disszociáció (ETD) segítségével. Ez az analízis módszer hazánkban nem elérhető.

Az analízisek eredményeképpen kb. 40 O-glikozilációs helyet azonosítottunk – ezek zöme eddig ismeretlen volt. Miután az ETD analízis viszonylag új MS/MS technika, az adatokat-értelmező szoftvert is ki kellett fejleszteni. Glikopeptid-analízisünk az egyik hajtómotorja volt a Protein Prospector adatbáziskereső program ilyen irányú fejlesztésének.

Az analízishez szükséges eszközök fejlesztése után, ismét az izolálási módszerek fejlesztésére kerül a hangsúly, és ezen a területen szeretnénk tovább munkálkodni.

2) Analitikai szempontból az O-glikoziláció körébe tartozik a sejten belüli, regulációs feladatokat ellátó, szintén Ser és Thr oldalláncon előforduló GlcNAc módosítás. Erre a poszt-transzlációs módosításra is dolgoztunk ki egy dúsítási eljárást. Az eljárás kémiai változásokon alapul: a GlcNAc vicinális hidroxilcsoportjait perjodát oxidációval karbonillá alakítjuk, amelyek hidrazid-gyantával reagálnak. Az ily módon izolált glikopeptidek hidroxilamminnal elereszthetők. A módosított peptidek azonosítására, a glikozilációs helyek meghatározására CID és ETD analízist is használtunk. Ennek a módszernek az optimalizálásán, továbbfejlesztésén is dolgozunk.

#### *Publikációink a témában*

- 1) Affinity-enrichment and characterization of mucin core 1-type glycopeptides from bovine serum. **Z. Darula, K.F. Medzihradszky**. *Mol. Cell. Proteomics*. **8**: 2515-26 (2009). IF=8.834
- 2) Mass spectrometric analysis, automated identification and complete annotation of O-linked glycopeptides. **Z. Darula, R.J. Chalkley, P. Baker, A.L. Burlingame, K.F. Medzihradszky**. *Eur. J. Mass Spectrom.* In press. IF=1.167
- 3) Enrichment of O-GlcNAc modified proteins by the periodate oxidation – hydrazide resin capture approach. **E. Klement, Z. Lipinszki, Z. Kupihár, A. Udvardy, K. F. Medzihradszky**. *J. Prot. Res.* In press. IF=5.684
- 4) Improved identification of O-linked glycopeptides from ETD data with optimized scoring for different charge states and cleavage specificities. **Z. Darula, R.J. Chalkley, A. Lynn, P. Baker & K.F. Medzihradszky**. Submitted to *Amino Acids*. (felkérésre írt közlemény). IF=4.01

*Nemzetközi konferenciákon és külföldi egyetemeken tartott előadásaink a témában*

- 1) "Analysis of post-translational modifications: tricks, triumphs, and caveats." **Medzihradzsky F. Katalin**, 18<sup>th</sup> International Mass Spectrometry Conference, Bremen, Germany (2009 augusztus) (Keynote speaker)
- 2) Enrichment of O-GlcNAc modified proteins by periodate oxidation - hydrazide resin capture approach. **Klement Éva** 3<sup>rd</sup> Central and Eastern European Proteomic Conference, Budapest, Hungary (2009 október).
- 3) "Sweet success in O-GalNAc analysis. And some bitter aftertaste." **Medzihradzsky F. Katalin**, meghívott előadó, PhD Glycoanalysis & Glycochemistry Course and Mini-symposium, Kopenhagen, Denmark (2009 október)
- 4) "Sweet success in O-GalNAc analysis. And some bitter aftertaste." **Medzihradzsky F. Katalin**, meghívott előadó, University Of Southern Denmark, Odense (2009 október)
- 5) "Sweet success in O-linked glycopeptide analysis. And some bitter aftertaste." **Medzihradzsky F. Katalin**, meghívott előadó, the Barnett Institute, Boston (2010 február)
- 6) "Sweet success in O-linked glycopeptide analysis. And some bitter aftertaste." **Medzihradzsky F. Katalin**, meghívott előadó, San Francisco Bay Area Mass Spectrometry (BAMS) discussion group (2010 február).
- 7) Taking advantage of electron-transfer dissociation (ETD) – **Medzihradzsky F. Katalin**, 28<sup>th</sup> IMMS 2010 (május).

*Nemzetközi konferenciákon bemutatott poszttereink a témában*

- 1) Advances and Hurdles in O-linked Glycopeptide Analysis. **Z. Darula & K.F. Medzihradzsky**. 57<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry & Allied Topics, Philadelphia, PA (2009 május).
- 2) Enrichment and characterization of secreted glycopeptides bearing SA<sub>1-0</sub>Galβ1-3GalNAcα structures. **Z. Darula, K. F. Medzihradzsky**. 9<sup>th</sup> International Symposium on Mass Spectrometry in the Health and Life Sciences: Molecular and Cellular Proteomics, San Francisco, CA (2009 augusztus).
- 3) Enrichment of O-GlcNAc modified proteins by the periodate oxidation – hydrazide resin capture approach. **E. Klement, Z. Lipinszky, Z. Kupihar, A. Udvardy, K. F. Medzihradzsky**. 9<sup>th</sup> International Symposium on Mass Spectrometry in the Health and Life Sciences: Molecular and Cellular Proteomics, San Francisco, CA (2009 augusztus).
- 4) Mass spectrometric characterization of O-glycopeptides enriched from bovine serum. **Zs. Darula, K.F. Medzihradzsky**. 3<sup>rd</sup> Central and Eastern European Proteomic Conference, Budapest, Hungary (2009 október).
- 5) Structural characterization of glycopeptides: Integration of complementary CID and ETD based information. **K.F. Medzihradzsky**, A. Lynn, R.J. Chalkley, P.R. Baker, **Z. Darula**, A.L. Burlingame. 58<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Salt Lake City, UT (2010 május).