

A Föld lakosságának 4 %-a szenved diabetes mellitusban. A diabetes következtében emelkedett vércukorszint hatására a fehérjék bázikus oldallánccal rendelkező aminosavaihoz (lizin, arginin) glükóz molekulák kovalensen kapcsolódhatnak. A lejátszódó Maillard reakció termékeként Schiff bázisok jönnek létre, melyek további oxidáción esnek át és AGE-advanced glycation end-product) termék keletkeznek. Az AGE termékek felhalmozódnak a mesangiális expanzió területén és noduláris glomeruloszklerózis alakulhat ki a fokozott oxidatív stressz hatására, mely diabétesz következtében kialakult nephropátiát eredményez.

A human serum albumin (HSA) biológiai fél-életideje 17 nap és a szervezet glikált HSA szintje függ az átlagos vércukorszinttől, így a szérumban glikált HSA mennyisége információval szolgál a vér átlagos glükóz szintjéről a vérvételt megelőző 2 hétben.

Munkánk során egy szilárdfázisú extrakciós (SPE) módszert dolgoztunk ki a glikált triptikus peptidek dúsítására, mely során különböző szilikagél alapú állófázisokat (C18, C30, különböző pórusméretű C60-fullerén-szilikák) alkalmaztunk, majd a kinyert peptideket MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption /Ionization Time-of-Flight) tömegspektrométerrel detektáltuk.

Az alkalmazott SPE állófázisokra (C18, C30, C60 (10), C60 (30), C60(100)) kereskedelmi forgalomban kapható peptidekkel (Arg⁸-vasopressin, Leu-enkefalin, angiotensin I) reprodukálhatósági méréseket és kötőkapacitás vizsgálatokat végeztünk.

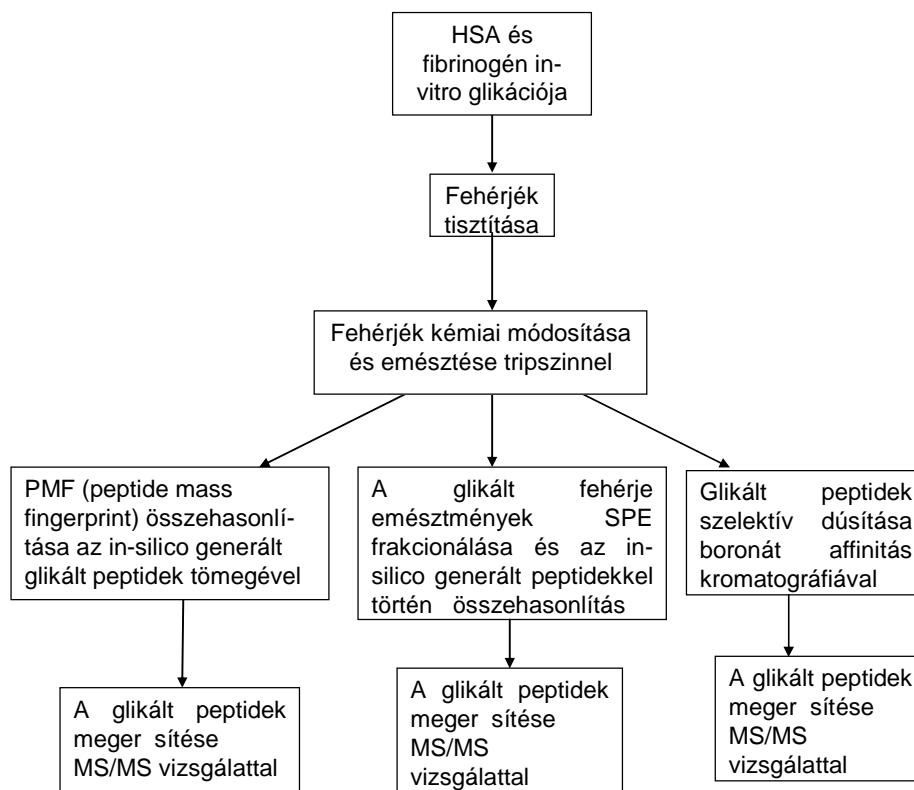
- A **reprodukálhatóság** mindhárom peptidre átlagosan: 10 RSD % körül adódott.
- Az egyes fázisok **visszanyerési vizsgálatát** különböző koncentrációjú Arg⁸-vasopressin, Leu-enkefalin, angiotensin I peptidoldatokkal végeztük (10, 30, 50 µg). Vizsgálataink eredménye azt mutatja, hogy a fent leírt peptidekre a legmagasabb visszanyerési adatokkal a C30-szilika és a 30nm pórusátméretű C60(30) fullerénszilika szolgált.
- A C30 és C60 (30) fázisokra **kötőkapacitás vizsgálatot** végeztünk különböző koncentrációjú (60-210 µg/mL) Leu-enkefalin oldatokkal. A kapott eredmények kiváló egyezést mutattak a Langmuir-féle elméleti adszorpciós modellel. A C60 (30) fullerén-szilika kötőkapacitása 31,5 mg/g, míg a C30-é ennek ötszöröse 153,9mg/g állófázisra nézve.
- Kereskedelmi forgalomban kapható HSA standard kémiai módosítása (diszulfid hidak redukálása és karbamidometilálás) követően a fehérjét tripszinnel emésztettük. Az így kapott protein emésztményt különböző **mátrixokkal** [(i)25mg/mL 2,5-dihidroxi-benzoésav (DHB) (ii)-telített -ciano-4-hidroxi-fahéjsav (CHCA) (iii)15mg/mL 2',4',6'-trihidroxiacetofenon (THA)] vizsgáltuk a lehető legnagyobb szekvenciafedettség elérése végett. A peptideket MALDI tömegspektrométerrel detektáltuk. CHCA mátrix-szal 42%, THA-val 68% és DHB

mátrix esetében 71,5%-os szekvencialefedettséget sikerült elérni. A DHB optimálisnak bizonyult a hosszú, t szer en képz d kristályok miatt, melyek alacsony lézerenergia alkalmazását teszik lehetővé, így jobb felbontás, nagyobb tömegpontosság és megbízhatóbb mérési eredmények érhetőek el. Mindezek miatt a további tömegspekrometriai mérésekhez a 25 mg/mL-es DHB mátrixot alkalmaztuk.

- HSA és fibrinogén standardokból kémiai módosítás után triptikus emésztményt készítettünk. Az emésztményeket különböző **SPE állófázisokon** (C18, C30, C60 (10 nm), C60 (30 nm), C60 (100 nm)) emelkedő szerves oldószer koncentráció mellett fracionáltuk. Az optimális SPE töltet kiválasztása a maximális szekvencia átfedés végett történt. HSA emésztményre a C30 (80,7%), és C18 (80,5%) szolgáltatta a legnagyobb szekvencialefedettséget. Fibrinogén emésztményre A -, B -láncra a C30 fázison legmagasabb a lefedettség (62,4% és 63,6%), míg a c-láncra csak 37,1% volt elérhető, a C30-as fázis összesítve fibrinogénre 55,6%-os lefedettséget szolgáltatott. Ezzel szemben a C60(30)-fullerén szilika mindhárom láncra 60% körüli (A -: 59,5%, B -: 63,1% , c-láncra 65% összesítve 62,2%) legjobb lefedettség adódott. A fenti eredmények alapján C30 és C60(30) fázisokat ítéltük optimálisnak.

- **Új SPE-n alapuló minta-el készítési eljárást** dolgoztunk ki nem-enzimatikusan glikálódott fehérjék triptikus emésztményének különböző szilikagél alapú állófázisokon (C30, C60(30)-fullerén-szilika) történő fracionálására és dúsítására.

Aszeptikus körülmények között in-vitro glikált HSA és fibrinogén (az utóbbi egy nemrég leírt, "short-term glycation" paraméter) emésztésével nyert peptidkeveréket fracionálás nélkül és lépcsőzetesen, emelkedő (5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%) acetonitril koncentráció mellett fracionáltuk. A peptidok analízisekor a fehérjék glikációs helyeit megállapítottuk és a kapott eredményt összehasonlítottuk boronát affinitáson alapuló glikált peptidok szelektív dúsítására alkalmas eljárással. A kapott eredményeket minden esetben összehasonlítottuk az in-silico generált glikált peptidok listájával és a kapott glikált peptidokat MS/MS vizsgálattal erősítettük meg. (1. ábra)



1. ábra

Összesen 69 lehetséges glikációs helyet sikerült glikált HSA emésztményb 1 feltérképeznünk, melyb 1 eddig 59 volt ismert az irodalomban. **Tíz új lehetséges glikációs helyet** határoztunk meg az új mintael készítési eljárás segítségével: R81, K93, R98, K106, R114, R337, R348, R521, K560, K564. A C30 fázison 34, C60(30)-on pedig 36 glikált peptidet azonosítottunk.

- Els ként térképeztük fel a **fibrinogén lehetséges glikációs helyeit** az általunk újonnan kidolgozott mintael készítési eljárás segítségével.

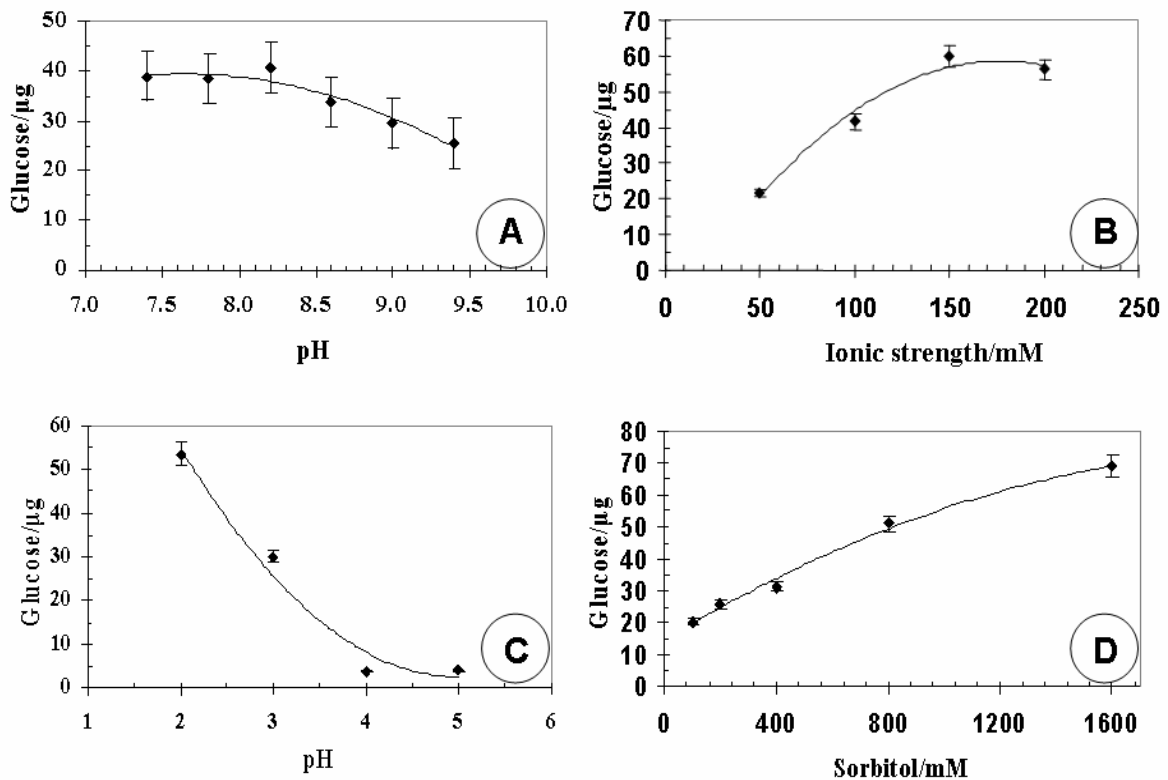
A nem frakcionált fibrinogén emésztményb 1 az A -lánc lehetséges 72 glikációs helyéb 1 42-t azonosítottunk. C30 fázist alkalmazva 67, míg C60(30) fázist alkalmazva 63 glikációs hely detektálására került sor. B -láncon frakcionálás nélkül 25 (a lehetséges 59 –b 1), C30 szilikával 53 és C60(30) fázissal 47 került azonosításra. C-láncon a 41 lehetséges glikációs helyb 1 24-t, a nem frakcionált emésztményb 1 33-t C30 szilikával, és 34-t C60(30) fullerénszilika fázissal azonosítottunk.

- A fent említett, már standardokra optimalizált SPE anyagokat használtuk módosított fehérjékre, az egyes frakciókat MALDI-TOF tömegspektrométerrel detektáltuk a peptide

mass fingerprintb l (PMF) a glikáltsági helyeket. Ezek egy szoftware által generált, elméleti emésztésb l azonosíthatóak. Az in-vitro, magas glükózkoncentráció mellett kapott glikált HSA glikáltsági helyeinek azonosítása „térképként” szolgál a biológiai minták esetén sokkal alacsonyabb glükózkoncentráció mellett történt glikációs helyek azonosítására.

Munkánk folytatásaként:

- **Optimalizáltuk** a glikált fehérje emésztmények szelektív dúsítására alkalmas **boronát-affinitáskromatográfias körülményeket**. Korábbi boronát affinitás kromatográfias vizsgálataink eredménye nem felelt meg az elvárásoknak, ennek megfelelő en optimalizáltuk a dúsítási körülményeket.

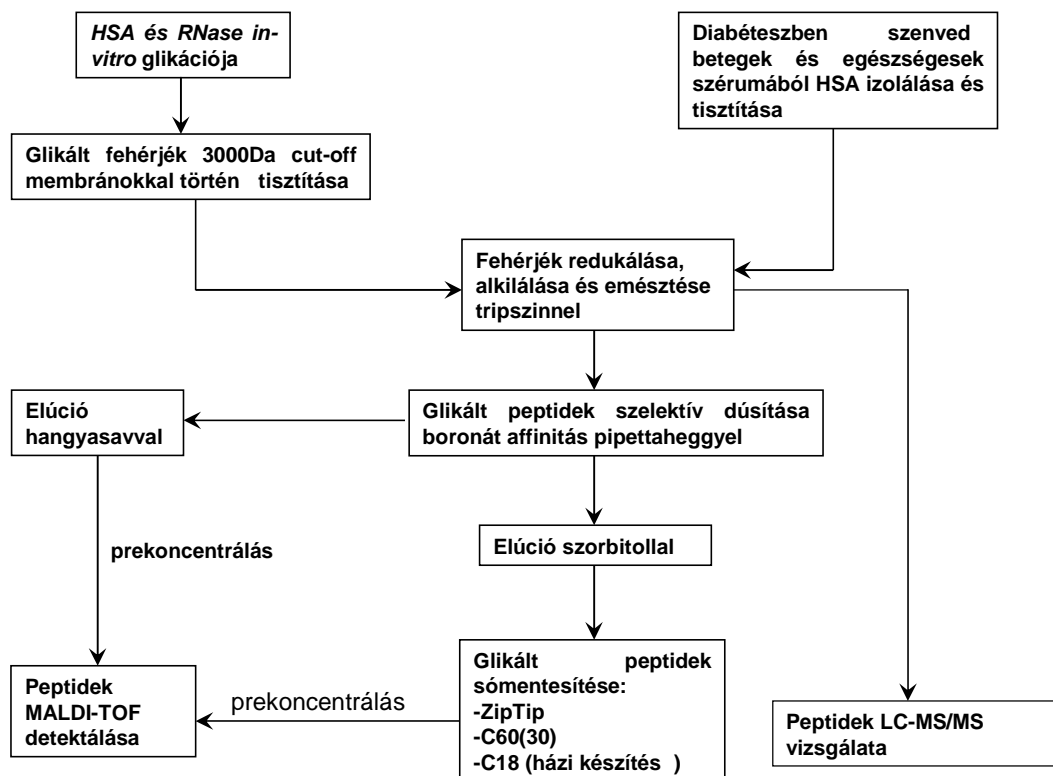


2. ábra

A boronát affinitás pipettahegyek *cisz*-diol szelektív dúsítási körülményeit glükóz oldatra optimalizáltuk. Vizsgálatunk eredményei szerint **150 mM ammóniumklorid/ ammónia** (2. ábra B), **50 mM magnéziumszulfát** , **ph 8,2** (2. ábra A) az optimális köt puffer összetétele. Irodalmi adatok szerint a szelektíven dúsított *cisz*-diolok elúciójára alacsony ph-jú hangyasav oldat vagy magas koncentrációjú szorbitol oldat is alkalmas. Optimalizálva az elúciós

körülményeket: **hangyasav ph 2** (2. ábra C), és a **1,2 M szorbitol oldatok** (2. ábra D) bizonyultak optimálisnak.

- Az általunk optimalizált (fent ismertetett) kötési és elúciós körülményeket alkalmaztuk az in-vitro glikált HSA és RNase triptikus emésztményére (3. ábra). A szelektíven dúsított peptidek detektálása MALDI-TOF tömegspektrométerrel történt. Más kutatócsoportok által alkalmazott taurin puffer és a korábban optimalizált ammóniumklorid/ammónia puffer hatékonyságát is összevetettük. Az egyszeresen és kétszeresen glikált peptideket tekintve is az optimalizált **ammóniumklorid/ammónia puffer** bizonyult hatékonyabbnak. A szorbitolos elúció utáni kisózáshoz a laboratóriumunkban elkészített C18-as, C60 (30) fullerén-szilika és ZipTip C18 fázisokat teszteltük.. Glikált peptidek sómentesítésére a **C60(30) és ZipTip bizonyult** optimálisnak a fázisok segítségével megtalált legnagyobb mennyiség egyszeresen és kétszeresen glikált peptidek alapján.



3. ábra

- Optimalizáltuk a nem glikált HSA illetve glikált HSA standardokból készült emésztmények **micro-HPLC-ESI/MS tandem tömegspektrometriás** elválasztását. Micro-HPLC-ESI/MS tandem tömegspektrometriás módszerrel azonosított glikált peptideket, glikációs helyeket MSⁿ technikával erősítettük meg (micro-HPLC-ESI/MS mérések Innsbrucki Egyetem Analitikai és Radiokémiai tanszéken készültek az intézet munkatársainak együttműködésével). Ezzel a módszerrel nem csak a primer, glükózegységeket tartalmazó peptidek (Amadori termékeket), hanem a belső oxidatív stressz hatására keletkező AGE (advanced glycation end products) származékok is azonosíthatók voltak. Az on-line(LC-MS), illetve az off-line (SPE-MALDI) módszereket összehasonlítottuk. Az off-line módszerünk az on-line LC-MS módszerrel szemben jobbnak bizonyult, mind glikált HSA és RNase A emésztményekre, mind az azonosított egyszerűen glikált peptidek, duplán glikált peptidek, mind pedig glikációs helyek számát tekintve.
- Sikeresen határoztunk meg nem glikált albumin emésztményből glikált peptideket, glikációs helyeket, ezek az albumin **elsődleges glikációs helyei**, melyek normál vércukorszint mellett is glikálódhatnak (K233, K378, K525, K545).
- Munkánk második fele átvezet a klinikai minták vizsgálatához. Kettőtípusú diabéteszben szenvedő betegektől és egészséges önkéntesektől szérumból mintát gyűjtöttünk. A betegek körülményeinek kiválasztása Prof. dr. Wittman István által vezetett kutatócsoportból Dr. Markó Lajos klinikus (II. számú Belgyógyászati Klinikával és Nefrológiai Centrummal) segítségével történt. Négy 4 diabétes mellitus-ban szenvedő beteg és 4 nem diabéteszes kontrol vérszérumból nyert HSA glikáltsági szintjét az általunk optimalizált módszerekkel vizsgáltuk. Különbséget véltünk felfedezni a beteg és kontrol csoport szérumból HSA glikáltsági szintje között, a várakozásoknak megfelelően **több lehetséges glikációs hely módosult** a diabétes mellitus-ban szenvedő betegek esetében.
- A **K414 és R428**-as glikációs hely **biomarker** jelentéssel bír lehet, mivel ezen glikációs helyeket minden diabéteszben szenvedő beteg szérumból sikerült kimutatni, míg a kontrol csoportban levő egy mintában sem volt fellelhető.
- Az fent leírt eredmények igazolására a **klinikai vizsgálatokat** kibővítettük. Három betegcsoportot határoztunk meg Prof. dr. Wittman István (II. számú Belgyógyászati Klinikával és Nefrológiai Centrummal) segítségével.
 - 1) Diabétes mellitus, hipertónia
 - 2) Diabétes mellitus, hipertónia, azotémia (diabétes következtében kialakult vesebetegség)
 - 3) hipertónia, azotémia (nem diabétes mellitus következtében kialakult vesebetegség)

A betegcsoportokat 10-10 f ben határoztuk meg. Minden betegt l vér és vizelet mintát gy jtöttünk. A korábbi kromatográfiás HSA tisztítás helyett immunreakción alapuló HSA tisztítást végeztünk. A tripszinnel emésztett fehérjéb l a glikált peptideket a korábban kidolgozott, optimalizált boronát affinitás kromatográfiás eljárással dúsítottuk. Az így kinyert glikált peptideket MALDI-TOF tömegspektrométerrel detektáltuk. A mérések és kiértékelések a nagy mintaszám miatt még folyamatban vannak, az eredmények hamarosan közlésre kerülnek.

- Potenciális biomarkert sikerült folyadékkromatografiás és tömegspektrometriás módszerekkel Crohn beteg vizeletéb l azonosítani a II. számú Belgyógyászati Klinika együtm ködéssel. z **-1-savas glikoprotein 1-2, cink- -2-glikoprotein** fehérje biomarkerek mennyisége a betegség különböz stádiumaiban eltér .
- Különbséget mutattunk ki MALDI-TOF technikával Shigella zonei mutáns törzsek endotoxiunjainak (LPS) struktúráiban a teljes core és Lipid A szerkezetek megadásával.