

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA



ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2021

ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV

eŠVK
PRIF UK
2021

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA**



**ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ
KONFERENCIA PriF UK 2021**

Zborník recenzovaných príspevkov

21. Apríl 2021
Bratislava, Slovenská republika
Univerzita Komenského v Bratislave
ISBN 978-80-223-5132-4

Hmotnostná spektrometria v glykoprofilovaní pacientov so zriedkavými dedičnými poruchami metabolizmu

Rebeka Kodríková^{1,2}, Zuzana Pakanová², Ján Mucha², Marek Nemčovič², Peter Baráth²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra biochémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; rebeka.kodrikova@gmail.com

²Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Centrum glykomiky, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Mass spectrometry in glycoprofiling of patients with rare inherited defects of metabolism

A patient suspected of suffering from congenital disorder of glycosylation (CDG) underwent a detailed analysis of blood serum *N*-glycoprofile by MALDI-TOF mass spectrometry because the result from the standard CDG-isoelectric focusing of serum transferrin glycoforms was ambiguous. MALDI-TOF analysis of permethylated serum *N*-linked glycans obtained by *PNGaseF* deglycosylation revealed the presence of a family of aberrant high-mannose *N*-linked glycans (HexNAc1Hex5 – HexNAc1Hex8) with only one *N*-acetylglucosamine (HexNAc) in the *N*-linked glycan core. The presence of high-mannose *N*-linked glycans containing two *N*-acetylglucosamines in their core, which is usually reported in healthy controls, was not detected or was present in low intensities. With detailed analysis was confirmed the hypothesis of a metabolic deficiency of the *N*-glycosylation pathway, presumably in the early stages of the endoplasmic reticulum.

Keywords: mass spectrometry; MALDI TOF; congenital disorders of glycosylation

Úvod a formulácia cieľa

Vrodené poruchy glykozylácie (CDG) je rýchlo rastúca skupina ochorení, patriaca medzi zriedkavé metabolické ochorenia, zapríčinené poruchami v komplexných chemických a enzymatických procesoch glykozylácie. Dodnes bolo identifikovaných viac než 130 monogénnych CDG subtypov, pričom celosvetovo bolo diagnostikovaných približne 1200 prípadov. CDG ochorenia rozdeľujeme do dvoch skupín : CDG-I a CDG-II. Skupina ochorení CDG-I vzniká v dôsledku poruchy syntézy dolicholofostátového oligosacharidu a prenosu oligosacharidu z dolicholofosfátu na –NH₂ skupinu Asp. Medzi typ CDG-II zaraďujeme ochorenia spôsobené poruchami v procese ďalšieho spracovania a modifikácie glykoproteínov v endoplazmatickom retikule a Golgiho aparáte [1,2].

V práci chceme špecifikovať poruchy pacienta, s podozrením na CDG ochorenie, na základe klinických prejavov porúch, typických pre CDG ochorenia (napr. hypotónia, kardiomyopatie, záchvaty, gastrointestiálne poruchy) a na základe nejasného výsledku izoelektrickej fokusácie krvného transferínu, čo je štandardná metóda stanovenia CDG ochorení [3].

Cieľom práce je štruktúrna analýza sérového N-glykoprotéinu pacienta s podozrením na vrodenú poruchu glykozylácie hmotnostnou spektrometriou MALDI-TOF/TOF a prípadná špecifikácia miesta poruchy enzýmovej výstavby N-glykánu.

Materiál a metódy

1. Deglykozylácia: K 10 μ L krvného séra a 10 μ L sérových glykoproteínov (50 μ L krvného séra sa najskôr precipitovalo acetónom 2 h pri -20 °C, precipitát sa následne rozpustil v 10 μ L roztoku - 10mM Tris-HCl, 0,1% SDS s výsledným pH 7,5) bolo pridaných 40 μ L roztoku - 10mM Tris-HCl, 0,1% SDS s výsledným pH 7,5. Vzorky sa inkubovali 5 minút pri 95 °C. Po ochladení (ľadový kúpeľ) sa k vzorkám pridalo 0,5 μ L enzýmu PNGázy F a nechali sa inkubovať cez noc pri 37 °C. Odštiepené glykány sa chromatograficky delili na 1ml PGC kolónach (PGC, z *angl. porous graphic carbon*, ENVI-Carb, Supelco). Finálna elúcia pre neutrálne glykány bola 2 x 500 μ L s 40 % ACN a pre kyslé 2 x 500 μ L 60 % ACN a 0,1 % TFA. Purifikované N-glykány z krvného séra, z glykoproteínov krvného séra so vzorkou nedeglykozylovaného krvného séra a 100 μ L vzorku moču sa vysušilo lyofilizáciou cez noc.

2. Permetylácia: Ku všetkým typom lyofilizovaných vzoriek sa pridalo 150 μ L zmesi NaOH/DMSO, ktorá bola predtým dôkladne roztrápaná vo vysušenej trecej miske. Následne sa pridal alikvótny objem jódetánu, zmes sa 5 min intenzívne pretrepávala a následne 50 min inkubovala na rotačnej trepačke (25 °C, 2000 rpm). Po stuhnutí sa zmes pomalým prídávaním 200 μ L ľadovej vody rozpustila a permetylované glykány sa extrahovali do chloroformu. Organická fáza sa neutralizovala premývaním s H₂O. Vysušené permetylované vzorky sa rozpustili v 10 μ L 50% metanolu.

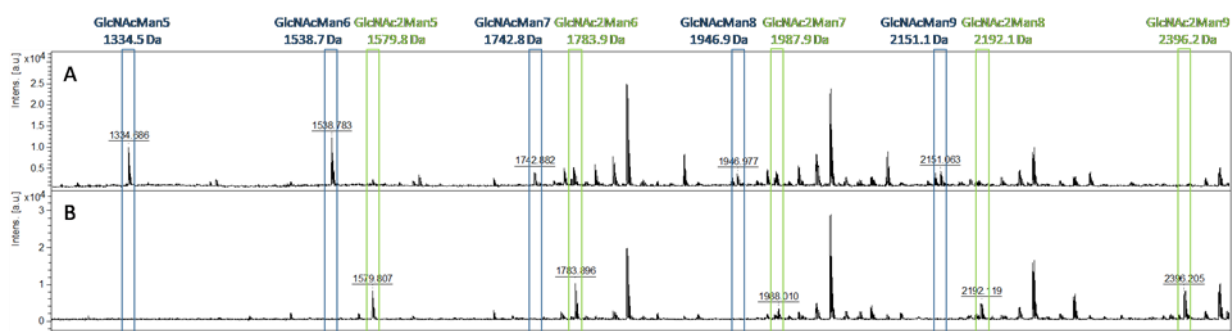
3. MALDI-TOF MS analýza: K 1 μ L vzorky nanesej na MALDI platničku (Groundsteel, Bruker Daltonics, USA) sa pridal 1 μ L matrice - kyselina 2,4-dihydroxybenzoová (DHB). Po vysušení pri laboratórnej teplote sa vzorka analyzovala v reflektívnom pozitívnom móde laserom indukovanej ionizácii MALDI-TOF spektrometra UltrafleXtreme II (Bruker Daltonics, Germany). Získané spektrá sa spracovali softvérom FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics, Germany) a vyhodnotili pomocou GlycoWorkbench (www.eurocarbdb.org).

Výsledky a diskusia

Naším cieľom bola podrobnejšia charakterizácia N-glykoprotéinu pacienta s podozrením na vrodenú poruchu glykozylácie a detailnejšia špecifikácia výsledku nejasného profilu IEF

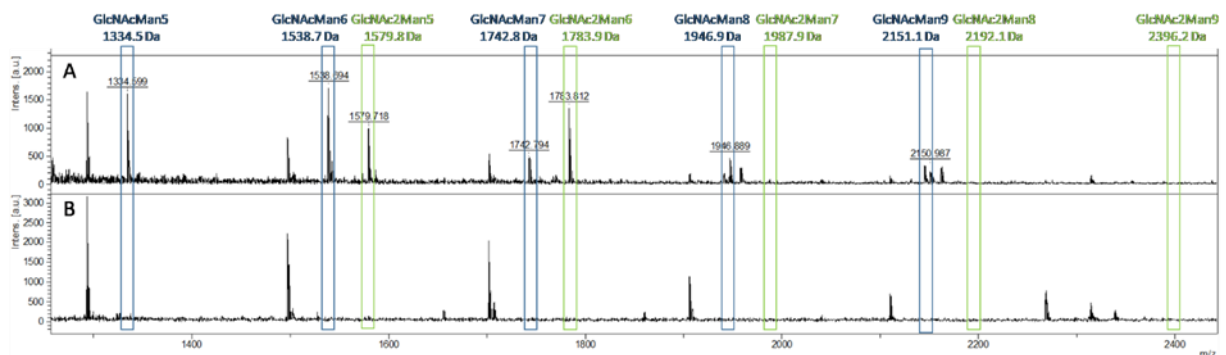
krvného transferínu pacienta pomocou hmotnostnej spektrometrie, analýzou MALDI-TOF/TOF.

MALDI-TOF analýza identifikovala vo vzorke N-glykánov pacienta (enzymaticky uvoľnených z krvného séra PNGázou F) výrazné zmeny oproti štandardnému ľudskému séru, slúžiacemu ako kontrola. Prítomnosť vysokomanozylovaných N-glykánov (GlcNAc₂Hex₅ – (1579,78 Da) – GlcNAc₂Hex₇ – (1987,98 Da)) sa v N-glykoproteome pacienta opakovane nepotvrdila. Identifikovala sa však vo vysokej intenzite séria aberantných vysokomanozylovaných N-glykánov s jedným N-acetylglukozamínom (GlcNAcHex₅ – (1334,65 Da) – GlcNAcHex₈(1946,95 Da)), vid' obr. 1.



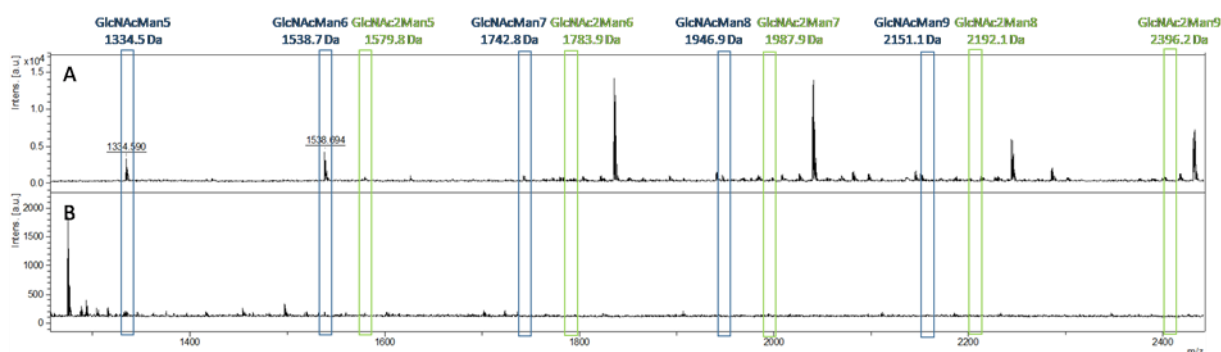
Obr. 1. MALDI-TOF permetlyovaných enzymaticky (PNGáza F) uvoľnených N-glykánov a) pacienta a b) zdravého ľudského séra

Aberantné N-glykány s jedným N-acetylglukozamínom sme pozorovali nielen vo vzorkách po enzymatickom štiepení PNGázou F, ale aj vo vzorke voľných sérových permetlyovaných N-glykánov pacienta, bez použitia PNGázy F (Obr 2.) Naopak, pri analýze voľných glykánov v moči sme aberantné glykány u pacienta nepozorovali (Obr. 3).



Obr. 2. MALDI-TOF permetlyovaných voľných N-glykánov a) pacienta b) zdravého ľudského séra

Analýza voľných N-glykánov v sére potvrdila iba malé zmeny v zastúpení N-glykánov (Obr. 2, Tab.1), zatiaľ čo MALDI-TOF analýza, enzymaticky uvoľnených N-glykánov precipitovaných z glykoproteínov z krvného séra, sa identifikoval podobný trend výskytu aberantných N-glykánov pacienta (Obr. 3, Tab. 1).



Obr. 3. MALDI-TOF permetylovaných a) enzymaticky uvoľnených N-glykánov z glykoproteínov precipitovaných z krvného séra pacienta a b) voľných oligosacharidov v moči pacienta

Tab. 1. Sumárna tabuľka výskytu glykánov

	<u>Aberantné N-glykány</u>				<u>N-glykány</u>		
m/z (Da)	1334,65	1538,75	1742,85	1946,95	1579,78	1783,88	1987,98
Štruktúra							
Pacient sérové N-glykány (PNGáza F)	XXX	XXX	XXX	XXX	-	-	-
Kontrola sérové N-glykány (PNGáza F)	-	-	-	-	XXX	XXX	XXX
Pacient voľné sérové N-glykány	X	X	X	X	X	X	X
Kontrola voľné sérové N-glykány	-	-	-	-	-	-	-
Pacient glykoproteín – N-glykány (PNGáza F)	XXX	XXX	XXX	XXX	-	-	-
Pacient Voľné oligosacharidy v moči	-	-	-	-	-	-	-

Záver

V práci sme analyzovali sérový N-glykoprofil pacienta s podozrením na CDG ochorenie, ktorý sme porovnávali so zdravým kontrolným sérom. Potvrdili sme, že využitie hmotnostnej spektrometrie je v porovnaní so štandardnou skríningovou metódou, izoelektrickou fokusáciou transferínu špecifickejšie, pričom poskytuje podrobnejší obraz o zmenách v procese glykozylácie, čo sa následne odráža na aberantnom N-glykoprofile.

Prítomnosť aberantných vysokomanozylovaných glykánov (HexNAcHex5 – HexNAcHex8), získaných enzymatickým štiepením glykoproteínov z krvného séra pacienta, poukazuje na defekt v prvých krokoch syntézy N-glykánov lokalizovaných v endoplazmatickom retikule, kedy dochádza k tvorbe základného oligosacharidu, tzv. LLO prekurzora. Analýza voľných oligosacharidov v moči pacienta nepotvrdila prítomnosť abnormálnych N-glykánov, čo vylučuje poruchu v hydrolýze lyzozomálnych glykánov. Na základe jednotlivých poznatkov a získaného N-glykoprotílu, môžeme vysloviť podozrenie, že pacient má vrodennú poruchu glykozylácie typu I (CDG-I), s predpokladom, že by mohlo ísť o mutáciu v géne *DPAGT1*, ktorý kóduje enzým UDP-*N*-acetylglukozamíndolichyl-fosfát *N*-acetylglukozamínfosfotransferázu, zabezpečujúcu pripojenie GlcNAc na -NH₂ skupinu asparagínu, alebo mutáciu v génoch *ALG13* a *ALG14*, kódujúcich enzým UDP-*N*-acetylglukozamínyl-transferázu, pripájajúcu druhú molekulu GlcNAc. Predpokladáme, že definitívnu odpoveď nám poskytne kombinácia výsledkov z MS glykoprotílovania a z analýzy genómu (celoexómového sekvenovania) pacienta.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0336, vedeckým grantom VEGA 2/0060/21 a Ministerstvom zdravotníctva Slovenskej republiky v rámci projektu s registračným číslom 2019/7-CHÚSAV-4. Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná štruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Nakayama Y., Nakamura N., Tsuji D., et al. (2013) *Genetic Disorders*. p. 243
- [2] Péanne R., de Lonlay P., Foulquier F., et al. (2018). *Eur. J. Med. Genet.* 61(11), p. 643
- [3] Goreta S. S., Dabelic S., Dumic J. (2012) *Biochem. Med.* 22(2), p. 156