



ZBORNÍK PRÍSPEVKOV

3. KONFERENCIE

CENTRA EXCELENTNOSTI

Aplikácia OMICS nástrojov v štúdiu vzniku chorôb a ich prevencie



Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, Bratislava

30. november 2022

Recenzent

RNDr. Jana Bellová, PhD.

chemjbel@savba.sk

Editor

Mgr. Mária Šedivá, PhD.

chemsedm@savba.sk

Ing. Mária Kopáčová

chemmari@savba.sk

ISBN 978 – 80 – 971665 – 4 - 0

N-glykoprolácia fibroblastov pre štúdiu zmien v ľudskom glykóme

Rebeka Kodríková¹, Marek Nemčovič¹, Maroš Krchňák¹, Filip Květoň¹, Zuzana Pakanová¹, Peter Baráth¹, Paula Videira², Ján Mucha¹

1 - Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v.v.i., Centrum glykomiky, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava, Slovenská republika; chemrkod@savba.sk

2 - UCIBIO, Departamento Ciências da Vida, NOVA School of Science and Technology, Caparica, 2825-149 Lisbon, Portugal

Úvod

Všetky bunky organizmu obsahujú vo svojej štruktúre oligosacharidové zložky – glykány, podieľajúce sa na mnohých kľúčových biologických procesoch (ochrana, bunková komunikácia, diferenciácia, štruktúrna funkcia, imunitné reakcie). Zastúpenie celkových glykánov (glykóm) buniek sa mení v závislosti od stavu organizmu, ktorý môže byť ovplyvnený množstvom faktorov, ako je vek a starnutie organizmu, rôzne ochorenia (napr. diabeto mellitus, a rakovina), zápalové reakcie a pod. [1]. Pre sledovanie zmien v glykóme sme zvolili mezenchymálne bunky – fibroblasty, ktoré sú esenciálnou súčasťou spojivových tkanív a orgánov. Vďaka produkcii tropokolagénu (prekurzor kolagénu) zohrávajú dôležitú funkciu najmä pri fyziologickej reparácii tkanív a regenerácii kože [2]. Pozorovanie zmien v štruktúre glykánov buniek organizmov môže umožniť bližšie pochopenie funkcií glykómu pri jednotlivých ochoreniach, v našom prípade pri vrodených poruchách glykozylácie, ale aj pri stresových a imunitných reakciách organizmu [3].

V práci prezentujeme optimalizáciu výberu vhodnej metódy pre lýzu buniek a následnú izoláciu glykánov z fibroblastov. Na identifikáciu glykánových štruktúr získaných z fibroblastov bola využitá hmotnostná spektrometria MALDI-TOF MS. Výsledkom práce je optimalizovaný protokol pre izoláciu glykánov z fibroblastov, ktorý bude ďalej využívaný pre štúdiu zmien glykómu v spojení s vrodenými poruchami glykozylácie.

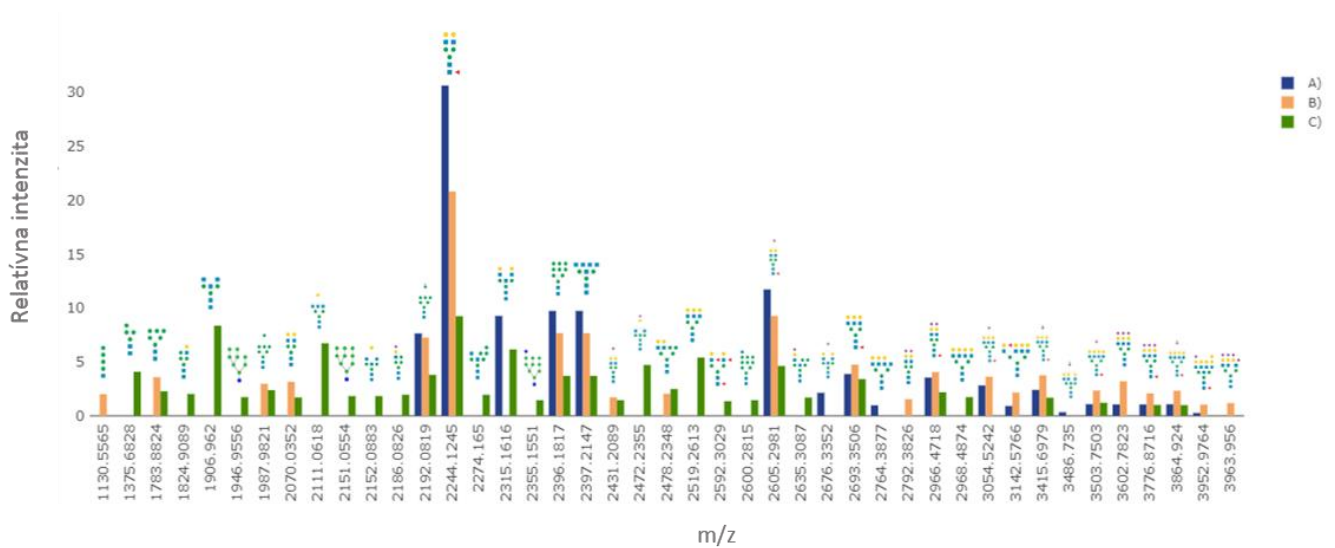
Materiál a metódy

Na lýzu buniek a získanie glykoproteínov z fibroblastov boli využité tri metódy:

- A) využitie denaturačných vlastností močoviny (10 mM urea/HEPES, pH 7,4),
- B) sonikácia v hypotonickom prostredí (20 mM HEPES-KOH, 0,25M sacharóza, pH 7,4),
- C) dezintegrácia bunkovej membrány mrazom v deglykozylačnom pufri (10 mM Tris-HCl, pH 7,5).

N-glykány boli vo všetkých troch prípadoch získané enzymatickým štiepením (PNGáza F) glykoproteínov fibroblastov, pričom boli následne od iných biomakromolekúl separované na SPE kolónkach a modifikované permetyláciou na stabilizáciu N-glykánov. Na identifikáciu glykánových štruktúr bol použitý MALDI-TOF/TOF hmotnostný spektrometer Bruker UltrafleXtreme. Výsledky boli vyhodnotené v programe vyvíjanom na oddelení glykobiológie SAV – matchMass.

Výsledky a diskusia



Obr. 1: Porovnanie metód izolácie na základe zastúpenia glykánov získaných danou metódou.

Izolácia glykánov pomocou A) denaturačných vlastností močoviny B) sonikácie C) zmrazenia.

Pri optimalizácii metód pre lýzu fibroblastov a izoláciu glykánov nás zaujímalo predovšetkým spektrum (vysokomanóзовé, komplexné a sialované glykány) a množstvo detegovaných glykánov, ktoré sa pri jednotlivých metódach líšili. Celkovo sme identifikovali 43 rôznych glykánových štruktúr. V prípade využitia močoviny ako denaturačného činidla na lýzu buniek sa nám podarilo identifikovať najmenšie spektrum (18) glykánových štruktúr, zatiaľ čo pri využití sonikácie (mechanickom rozbití buniek), bol identifikovaný väčší počet glykánov – 23, s vyššou variabilitou. Najširšiu škálu a množstvo (33) glykánových štruktúr sme detegovali pri použití dezintegrácie bunkových membrán mrazom.

Na základe získaných výsledkov sa ako najvhodnejšia metóda ukázala lýza fibroblastov prostredníctvom narušenia bunkových membrán mrazom. Touto metódou sa nám podarilo získať nielen najvyšší počet glykánov, no tiež najširšie spektrum glykánov – od vysokomanóзовých po komplexné sialované glykány, ktorých zastúpenie bolo pri zvyšných dvoch metódach nižšie.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená Ministerstvom zdravotníctva SR v rámci projektu s registračným číslom 2019/7-CHÚSAV-4, APVV-18-0336, a grantom VEGA 2/0060/21. Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt ITMS 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Dotz, V., & Wuhner, M. (2019). N-glycome signatures in human plasma: associations with physiology and major diseases. *FEBS letters*, 593(21), 2966–2976.
- [2] Alberts, B. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (6th ed.). W.W. Norton & Company.
- [3] Dick, M. K., Miao, J. H., & Limaiem, F. (2022). Histology, Fibroblast. In *StatPearls*. StatPearls Publishing