



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

Stanovenie N-glykoprotílu mikrovezikúl, potenciálneho zdroja nových glykobiomarkerov

Zuzana Pakanová¹, Veronika Lukáčová¹, Marek Nemčovič¹, Jaroslav Katrlík¹, Ján Mucha¹, Peter Baráth¹

¹*Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava*

Úvod

Mikrovezikuly sú extracelulárne vezikuly, ktoré vznikajú oddelením z bunkových membrán a uvoľňujú sa do extracelulárneho priestoru (do tkanív, telesných tekutín a pod.). Nie je možné ich uniformne charakterizovať a striktne definovať na báze hustoty, veľkosti, či tvaru (Simons a Raposo, 2009). Bunky tvoria mikrovezikuly na uľahčenie kontroly kvality nasyntetizovaných proteínov na plazmatickej membráne a voľné mikrovezikuly prenášajú signály, proteíny a RNA do susedných buniek. Podieľajú sa na mnohých fyziologických procesoch, najmä počas imunitnej signalizácie a pri rôznych ochoreniach, najmä imunodeficienciách a rakovine. Z tohto dôvodu predstavujú nový a doposiaľ neprebádaný zdroj potenciálnych biomarkerov. V prezentovanej práci bol stavený celkový N-glykoprotíl proteínov obsiahnutých v izolovaných mikrovezikulách z krvného séra.

Materiál a metódy

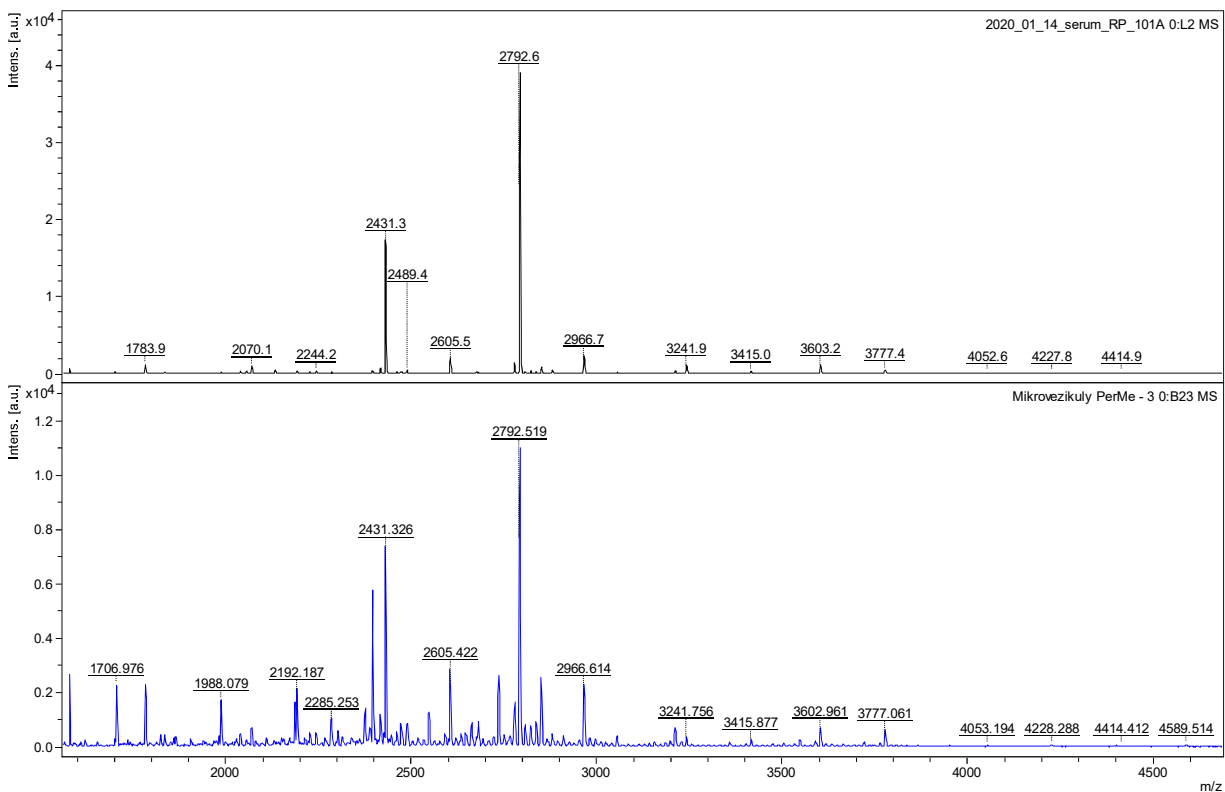
500 mikrolitrov séra, získaného homogénnym zlúčením sér 10 zdravých dospelých jednotlivcov (5 mužov a 5 žien) do jednej reprezentatívnej vzorky, bolo použitých na izoláciu mikrovezikúl prostredníctvom kitu Izon70 (Izon Science SAS, Francúzsko). Mikrovezikuly boli zo vzorky izolované frakciáciou podľa pokynov výrobcu.

Izolované mikrovezikuly boli podrobené tepelnej denaturácii s prídavkom SDS a po ochladení na izbovú teplotu bola pridaná peptid-N-glykozidáza F (Roche, Švajčiarsko). Vzorka bola inkubovaná cez noc a uvoľnené glykány boli izolované na poróznom grafitizovanom uhlíku a predanalyticky derivatizované permetyláciou.

Spektrá boli namerané na hmotnostnom spektrometri MALDI ultrafleXtreme II (Bruker, Nemecko) a porovnané so spektrami získanými obdobným spôsobom zo séra bez predchádzajúcej izolácie mikrovezikúl (negatívna kontrola).

Výsledky a diskusia

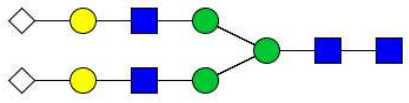
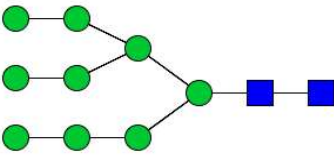
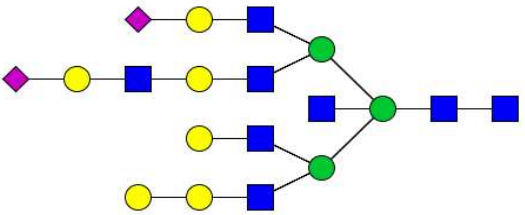
Uvedenými postupmi bol stanovený N-glykoprofil sérových mikrovezikúl, ktorý obsahoval štruktúry v rozmedzí približne m/z 1,500-4,800. Spektrum, získané analýzou N-glykánov z mikrovezikúl, porovnané so spektrom získaným zo samotného séra (negatívnej kontroly), je znázornené v Obr. 1.



Obr.1: MALDI-TOF-MS spektrum permetylovaných N-glykánov, získaných špecificky z obsahu mikrovezikúl (modré spektrum), porovnané s N-glykoprofilom sérových proteínov. Spektrá boli merané v reflektónovom pozitívnom iónovom móde, s pridaním 2,5-dihydroxybenzoovej kyseliny ako externej matrice.

V spektrách N-glykoprofilu obsahu mikrovezikúl boli pozorované výrazné signály oligohexózových jednotiek, ktoré pravdepodobne nepochádzajú z proteínov, ale nachádzajú sa vo vezikulách vo voľnej forme (kontaminanty). Okrem toho, niektoré N-glykány boli špecificky prítomné v mikrovezikulách vo výrazne zvýšených hladinách, a to najmä štruktúry uvedené v Tab1.

Pôvod týchto N-glykánov nie je známy, preto ďalším krokom bude stanovenie proteomického obsahu, prípadne analýza glykoproteínov, izolovaných špecificky z mikrovezikulových frakcií.

m/z	Štruktúra	Popis
m/z 2736		Hex5HexNAc4Neu2
m/z 2396		Hex9HexNAc2
m/z 4590		Hex9HexNAc8NeuAc2

Tab.1. Reprezentatívne N-glykány, pozorované v mikrovezikulách vo zvýšených hladinách porovnaním so sérom.

Štúdium obsahu mikrovezikul je môže viesť k objaveniu nových relevantných a špecifických biomarkerov rôznych ochorení, najmä metabolických či onkologických. Ku dnešnému dňu neboli popísané žiadne glykobiomarkery, obsiahnuté vo vezikulách a preto štúdium tejto problematiky predstavuje vysoký vedecký potenciál. V ďalších krokoch sa budeme venovať proteomickej analýze obsahu mikrovezikul a záverom bude korelácia glykomických a proteomických dát.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporovaná Ministerstvom zdravotníctva Slovenskej republiky v rámci projektu s registračným číslom 2019/7-CHÚSAV-4 a projektom 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

Gould SJ, Schaffer JE. Transport and Secretion | Exosomes and Microvesicles, Editor(s): Jez J. Encyclopedia of Biological Chemistry III (Third Edition), Elsevier, 2021:455-458, ISBN 9780128220405. doi: 10.1016/B978-0-12-819460-7.00245-0

Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. Curr Opin Cell Biol. 2009;21(4):575-581. doi:10.1016/j.ceb.2009.03.007