

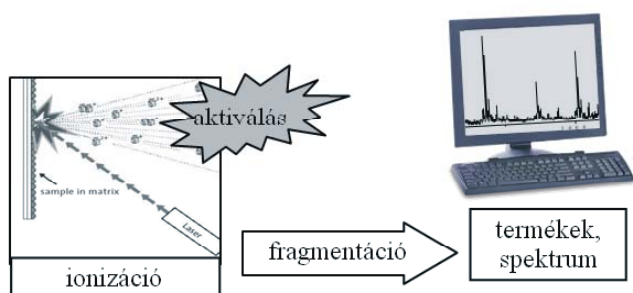
Stratégiaaváltás a tömegspektrometriában: biokémiai és orvosi kutatási irányzatok

VÉKEY Károly*, BIHARI Mária, DRAHOS László, GÖMÖRY Ágnes, IMRE Tímea, JAKAB Annamária, LUDÁNYI Krisztina, NAGY Kornél, POLLREISZ Ferenc, TAKÁTS Zoltán, ÚJSZÁSZY Kálmán

MTA Szerkezeti Kémiai Intézet, Budapest, Pusztaszeri út 59, H-1025

1. Bevezetés

A tömegspektrometria mind a szerkezetkutatás, mind pedig az analitika egyik legszélesebb körben alkalmazott módszere. Ennek sematikus vázlatát az 1. ábra mutatja:



1. Ábra. A tömegspektrometria sematikus vázlat

A mintából ionokat állítunk elő, majd meghatározzuk az ionok pontos tömegét és intenzitását. Az ionizáció során az ionokat gerjesztjük, mely bomlásukhoz (fragmentációhoz) vezet. Ennek jelentősége, hogy a molekuláról különböző atomcsoportok hasadnak le, mely az adott molekula szerkezetének függvénye. Ez teszi lehetővé, hogy a tömegspektrometriát a molekulaszervezet meghatározására használjuk. A tömegspektrométerben észlelt jel intenzitása a vizsgált anyagmennyiséggel arányos, ami az analitikai alkalmazások alapja. Az így nyert tömegspektrum az egyes ionok intenzitáseloszlását (előfordulásuk gyakoriságát) jelenti. A módszer rendkívül érzékeny, akár pmol, fmol mennyiségű anyag vizsgálatára is alkalmas.

A tömegspektrometria alapvető változásokon ment keresztül az utóbbi években, évtizedekben. Az új mintabeviteli módszerek (HPLC, kapilláris elektroforézis) és az új ionizációs technikák nagymértékben megkönnyítették és hatékonytá tették anyagkeverékek, nyomszennyezések ill. biológiai mátrixban lévő anyagok vizsgálatát. Előnyös tulajdonságai miatt a tömegspektrometriát a kémia számos területen használják, ezek közül is kiemelkedő jelentőségű a biokémia, a gyógyszeripar és a környezetvédelem.

2. Stratégiaaváltás – új kutatási koncepció

Az utóbbi években a tömegspektrometria alkalmazása a biokémiai és orvosi kutatások irányába tolódott el. A tudománytól elvárt, hogy társadalmi igényeket elégítsen ki, az egyik legfontosabb ilyen igény az életminőség javítása. Ennek egyik látványos jele az orvosi kémiai, orvosi analitikai kutatás-fejlesztés előretörése. A

tömegspektrometria ilyen irányú alkalmazását az új ionizációs módszerek (az úgynevezett elektroporlasztás és a MALDI ionizáció) kifejlesztése forradalmasította, lehetővé téve makromolekulák (elsősorban proteinek) és komplex keverékek (így például vér, vizelet) vizsgálatát. A tömegspektrometria jelentős előretörése ezen a területen elsősorban annak köszönhető, hogy a) kis mennyiségben rendelkezésre álló b) bonyolult mátrixokban lévő minor komponensekről is szerkezeti és mennyiségi információ nyerhető. Mindennek eredményeképpen a tömegspektrometria mind a biokémia, mind az orvosi analitika egyik fő eszközévé vált, melynek fontosságát a 2002 évi Nobel díj (Fenn, Tanaka: ESI és MALDI ionizációs módszerek kifejlesztése) jól jelzi.

Az orvosi diagnosztika egyik gyorsan fejlődő iránya a szervezet állapota és molekuláris jellemzők (egy-egy vegyületek megléte, vagy koncentrációváltozása) közötti összefüggések vizsgálatán alapul. Genetikai eltérések, proteinek, enzimek szintjén bekövetkező változások, ill. a szervezetben előforduló különböző kis molekulák (~1000 Da-nál kisebb molekulatömegű vegyületek, metabolitok) koncentrációváltozásai követhetők nyomon, esetenként kóros metabolitok megjelenése is bekövetkezik. Tömegspektrometriával mind kis molekulák, mind proteinek szintjén bekövetkező változások, eltérések vizsgálhatók, az ilyen irányú biokémiai, orvosi-analitikai kutatások gyors ütemben terjednek.

Az MTA Szerkezeti Kémiai Intézetében ennek a szemléletváltásnak a jelentőségét elsők között felismerve, nemzetközi tendenciákkal összhangban, új kutatási témákat indítottunk. Ezek részben módszertani jellegűek, részben pedig orvosi-analitikai célfeladatok megoldására irányultak és irányulnak.

3. Módszertani fejlesztések

Módszertani fejlesztéseink egyik célja a kutatás és a gyakorlati alkalmazások hatékonyságának növelése. Ma már a tömegspektrométerek működése jelentős mértékben automatizált (ill. automatizálható), így a kutatás és a gyakorlati alkalmazás egyik legidőigényesebb része az eredmények értékelése. Olyan számítógépes programcsomag kifejlesztésén dolgozunk, mely spektrumok értékelését segíti¹. Két kiemelt témakörre koncentrálnunk, egyrészt peptidek ún. de-novo szekvenálására, mely a proteomika talán legkevésbé megoldott feladata, másrészt

* Főszerző. Tel.: 438-4141; fax: 438-1157; e-mail: vekey@chemres.hu

gyógyszermetabolitok spektrumának elméleti előrejelzésére, mely a metabolitkutatást segíti és gyorsítja.

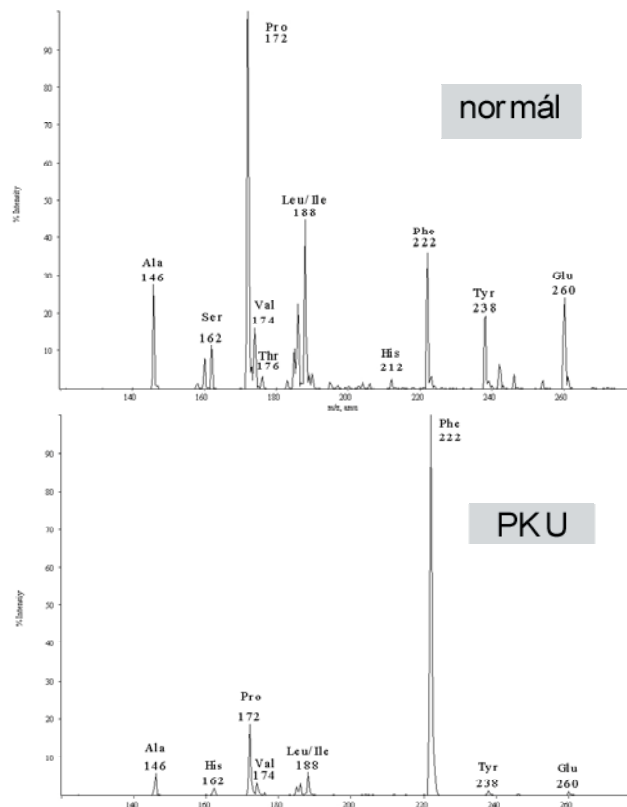
Metodikai kutatásaink másik fontos iránya új ionizációs módszerek fejlesztése. Olyan megoldást keresünk, mely felületek vizsgálatára alkalmas, így például szövetek ill. a testfelszín közvetlen vizsgálatát is lehetővé teszi. Távlati célunk élő szövetek vizsgálata, ami a tömegspektrometria biokémiai és orvosi alkalmazásait forradalmasíthatja.

4. Orvosi alkalmazások

Orvosi-analitikai munkánk célja, hogy segítsük betegségek korai kimutatását, a megfelelő gyógyszerek kiválasztását, és ezzel hozzájáruljunk a sikeres gyógykezeléshez. Ennek érdekében új módszereket dolgozunk ki, külföldön bevált módszereket adaptálunk, valamint ezeket alkalmazzuk orvosi célfeladatok megoldására. Ezek közül két témát mutatunk be, melyek jól illusztrálják mind a kis molekulákkal kapcsolatos klinikai alkalmazások, mind pedig a makromolekulákkal (proteomikával) kapcsolatos orvosbiológiai kutatások eredményeit.

Újszülöttkori anyagcsere rendellenességeket ma már számos országban tömegspektrometriás módszerekkel szűrnek. Ezt a külföldön már bevált technológiát a Heim Pál Kórház és a Budai Gyermek Kórházzal együttműködésben adaptáltuk, bevezettük a hazai gyakorlatba. A korai diagnózis lehetővé teszi számos anyagcsere betegség korai, rutinszerű kimutatását és gyógyítását, még a tünetek jelentkezése előtt. Ennek azért van igen nagy a jelentősége, mert ha a kezelést csak a tünetek megjelenése után kezdik el, maradandó károsodás, esetleg halál is bekövetkezhet. A módszerrel az anyagcsere során képződő különböző metabolitok (aminosavak és acilkarnitinek) vérbeli koncentrációját határozzuk meg. Kóros esetben egyes komponensek koncentrációja megváltozik – ezt detektáljuk tömegspektrometriával. Szűrőmódszerről lévén szó, a gyakorlati szempontok igen fontosak. Szűrőpapírra szárított vércseppet dolgozunk fel, mivel ennek szállítása problémamentes. A minta-előkészítés viszonylag egyszerű és könnyen automatizálható metanolos extrakció, melyet butilészter képzés követ. A vizsgálat eredményeként kapott aminosavprofil (2. ábra) jól jelzi az aminosav anyagcsere esetleges rendellenességeit. Az acilkarnitinekről analóg módon hasonló profilt nyerünk.

Az analízis tandem tömegspektrometriával (MS-MS-sel) történik, mely rendkívül specifikus és érzékeny analitikai technika. A tandem tömegspektrometria gyorsan terjedő, nagy teljesítőképességű módszer. Ez a hagyományos tömegspektrometriánál lényegesen szelektívebb, alkalmazása bonyolult keverékek, mátrixok esetén különösen előnyös. MS/MS esetén a célzott vegyületcsoport közös tömegspektrometriás fragmentációját használjuk ki e vegyületek szelektív azonosítására. Butilészter aminosavakra a butil-formiát ill. az ezt követő ammóniavesztés jellemző; így az MS/MS kísérletet úgy végezzük, hogy ezeket a folyamatokat detektálja. Acilkarnitinek közös jellemzője egy 85 Da tömegű fragmens megjelenése, így MS/MS segítségével ennek képződését használjuk azonosításra és mennyiségi meghatározásra³. Tandem tömegspektrometria alkalmazása lehetővé teszi a vérben ppm ill. ez alatti koncentrációban jelen levő aminosavak

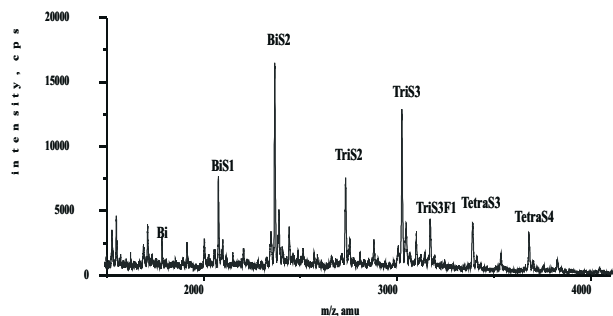


2. Ábra. Vér aminosavprofilja egészséges ill. fenilketonuriás (PKU) esetben

és karnitinek mennyiségi meghatározását anélkül, hogy előzetes vagy „on-line”, kromatográfias elválasztást kellene alkalmaznunk. Fontos hangsúlyozni, hogy az általában szokásos kromatográfias lépés elhagyása nem öncélú („mi még ezt is meg tudjuk csinálni”), hanem a vizsgálat idejének jelentős rövidítését szolgálja. Ez MS-MS esetén 1-2 percre rövidül, szemben a kromatográfias futáshoz szükséges, tipikusan mintegy 30 perc körüli idővel. Ez az időnyereség sorozatvizsgálatok esetén igen fontos szempont. Az itt ismertetett módszert validáltuk, és számos kórházzal együttműködve a gyakorlatban is alkalmazzuk. Az eddigiekben elsősorban célzott vizsgálatokat végeztünk, a sokszáz elvégzett vizsgálat során mintegy 25 anyagcserebeteg időben azonosítottunk. Ezzel jelentősen hozzájárultunk a sikeres gyógyításhoz, vizsgálatainknak több esetben életmentő szerepe is volt. A módszert a közeljövőben mint országosan kötelező (minden újszülöttnél elvégzendő) szűrővizsgálatot is bevezetik.

Orvos-analitikai kutatásaink másik fontos területe az ún. savas 1-alfa glikoprotein (AGP) vizsgálata, mely irány a proteomikához kapcsolódik. Az AGP egy igen heterogén szérumpférje, melyet több gén kódol. A peptidláncához 5 különböző helyen ún. „komplex” struktúrájú oligoszacharid csoportok kapcsolódnak (N-glikozileződés). Az oligoszacharid láncok változatos felépítésűek, jelenős heterogenitást mutatnak, amely a glikozileződés helyétől is függ. Kutatásaink célja az AGP glikozileződési mintázatának meghatározása és annak vizsgálata, hogy ez milyen jellemző változást szenved rákos megbetegedés esetén. Vizsgálataink első lépéseként az intakt glikoproteint tanulmányoztuk, melyet az Országos Onkológiai Intézetben, együttműködés keretében izoláltak⁴. Megállapítottuk, hogy a molekula,

az előzetes várakozásnak megfelelően igen heterogén, különböző szerkezeti változatának molekulatömege 30 és 45.000 Da közötti tartományban észlelhető. A vizsgálatok következő lépése a molekulán levő oligoszaccharid struktúrák szerkezetmeghatározása. A glikoproteintól PNGase F enzimvel lehasítottuk az oligoszaccharid láncokat, majd ezek szerkezetét MALDI tömegspektrometriával vizsgáltuk. Az AGP cukorfrakcióra jellemző MALDI tömegspektrum a 3. ábrán látható. Mintegy 40 különböző



3. Ábra. Egy AGP minta oligoszaccharid komponenseinek jellemző MALDI tömegspektruma.

szerkezetet azonosítottunk és meghatároztuk ezek eloszlását (előfordulási gyakoriságát). Megállapítottuk, hogy az oligoszaccharidok az egyes mintákban (a különböző személyekből izolált AGP esetén) jellemző, és egymástól eltérő eloszlást mutatnak^{5,6}. A szerkezetvizsgálat következő lépése az egyes glikozileződési pontok vizsgálata volt. A glikoproteint tripszinnel emésztettük, és a képződő glikopeptideket azonosítottuk kapilláris-HPLC-hez kapcsolt tömegspektrometria és tandem tömegspektrometria segítségével. A vizsgálat eredményeképp meghatároztuk a jellemző oligoszaccharid eloszlásokat. Megállapítottuk, hogy ez az eloszlás az egyes glikozileződési pontokon különböző, ami a molekula szerkezeti változatosságát tovább növeli. A glikoprotein szerkezetvizsgálatát követően megvizsgáltuk, hogy az oligoszaccharid eloszlás jellemzi-e, illetve milyen mértékben jellemzi a szervezet állapotát. A vizsgálathoz mintegy 40-50 különböző személytől származó AGP mintát használtunk fel, melyeket 3 különböző csoporttól származnak: (1) egészségesek, (2) ovarium tumoros ill. (3) lymphomás betegek. A tömegspektrometriás vizsgálat eredményeképp kapott oligoszaccharid eloszlásokat kemometriai módszerekkel értékeltük. Lineáris diszkriminancia analízis (LDA) segítségével sikeresen megkülönböztethetők mind az egészséges és a beteg, mind pedig a két különböző rákos megbetegedésben szenvedő egyének. Az eredmények azt mutatják, hogy a glikozileződés, ill. konkrétan az AGP glikozileződése a betegségre jellemző mintázatot mutat, így ez potenciálisan egy új, széles körben elfogadott onkomarker lehet.

New Focus in Mass Spectrometry: Biochemical and Biomedical Applications

Mass spectrometry is among the most important and widespread structure determination and analytical tools. For a long time its main application fields were related to organic chemistry, pharmaceutical and environmental applications, predominantly molecules below 1000 Da molecular mass were studied. Developments in methodology and instrumentation resulted in innovative

5. Kitekintés

A tömegspektrometria mintegy fél évszázada a szerkezetkutatás és az analitika egyik legfontosabb, legszélesebb körben használt módszere. Korábban ennek alkalmazása viszonylag kisméretű molekulákra korlátozódott. Az utóbbi évek módszertani fejlesztései eredményeképp óriásmolekulák, molekuláris komplexek, valamint igen bonyolult keverékek is vizsgálhatóvá váltak, aminek következtében a tömegspektrometria új kutatási területeken jutott kulcsfontosságú pozícióba. Ezek közül talán a biokémia és az orvosi analitika a legfontosabb, a tömegspektrometriai kutatások súlypontja is erre tolódott el. Várható, hogy a következő évtizedben a tömegspektrometria nem csak az orvosi kutatásban, hanem a klinikai gyakorlatban is jelentős szerepre tesz szert. Véleményünk szerint e területen, már csak társadalmi jelentősége miatt is, a közeljövőben forradalmi fejlődés várható, saját kutatásainkat is ilyen irányban koncentrálnánk.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket szeretnénk nyilvánítani jelenlegi és korábbi kollégáinknak, hazai és külföldi együttműködő partnereinknek, akik részvétele és segítsége nagy mértékben hozzájárult munkánk, kutatásaink sikeréhez. Ezek közül is kiemelném Prof. Kremmer Tibort, Dr Schuler Ágnes, Dr Szabó Terézt, Dr Schlosser Gittát, Dr Pócsfalvi Gabriellát, és Prof. Antonio Malornit, akikkel a fent bemutatott orvosi-diagnosztikai kutatásokat végezzük. Köszönettel tartozunk továbbá az OTKA T043538, a 1/A/005/2004 NKFP MediChem2 és az EU QLK2-CT-2002-90436 számú Center of Excellence in Biomolecular Chemistry projekteknek a kutatást lehetővé tevő pénzügyi támogatásért.

Hivatkozások

1. Drahos, L.; Vékey, K. *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 237-263.
2. Takats, Z.; Wiseman, J. M.; Gologan, B.; Cooks, R. G. *Science* **2004**, *306*, 471-473.
3. Nagy, K.; Takats, Z.; Pollreisz, F.; Szabo, T.; Vekey, K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 983-990.
4. Nagy, K.; Vekey, K.; Imre, T.; Ludanyi, K.; Barrow, M. P.; Derrick, P. *J. Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4998-5005.
5. Szollosi, T.; Kremmer, T.; Ludanyi, K.; Imre, T.; Schlosser, G.; Boldizsar, M.; Vincze, B.; Vekey, K. *Chromatographia* **2004**, *60*, S213-S219.
6. Kremmer, T.; Szollosi, E.; Boldizsar, M.; Vincze, B.; Ludanyi, K.; Imre, T.; Schlosser, G.; Vekey, K. *Biomed. Chromatography* **2004**, *18*, 323-329.

ionization techniques (making macromolecules amenable for mass spectrometry); in the widespread use of tandem mass spectrometry (yielding more structural information and facilitating mixture analysis); and convenient on-line coupling to chromatography. These developments opened new fields for application of mass spectrometry, among which proteomics, biochemistry and

biomedical applications are in the forefront of interest. Our own research efforts are concentrated in two closely interacting fields: Developments of new mass spectrometric technology and biomedical applications.

In the paper two recent applications in the biomedical field are discussed: Neonatal screening, based on the study of small molecules and the search for new tumor markers, related to proteomics (glycoproteins). Neonatal screening is widespread, and

is mostly based on tandem mass spectrometry. We have introduced this technique to Hungary, methods related to amino acid and acilcarnitine profiling have been applied in a clinical environment. We have studied the structural diversity (heterogeneity) of alpha-1-acid glycoprotein (AGP), and correlation between sugar structures and neoplastic diseases. It was found the the oligosaccharide distribution of this glycoprotein depends significantly on the state of the patient, the patterns corresponding to healthy subjects, ovarium tumor and lymphoma patients are characteristically different.