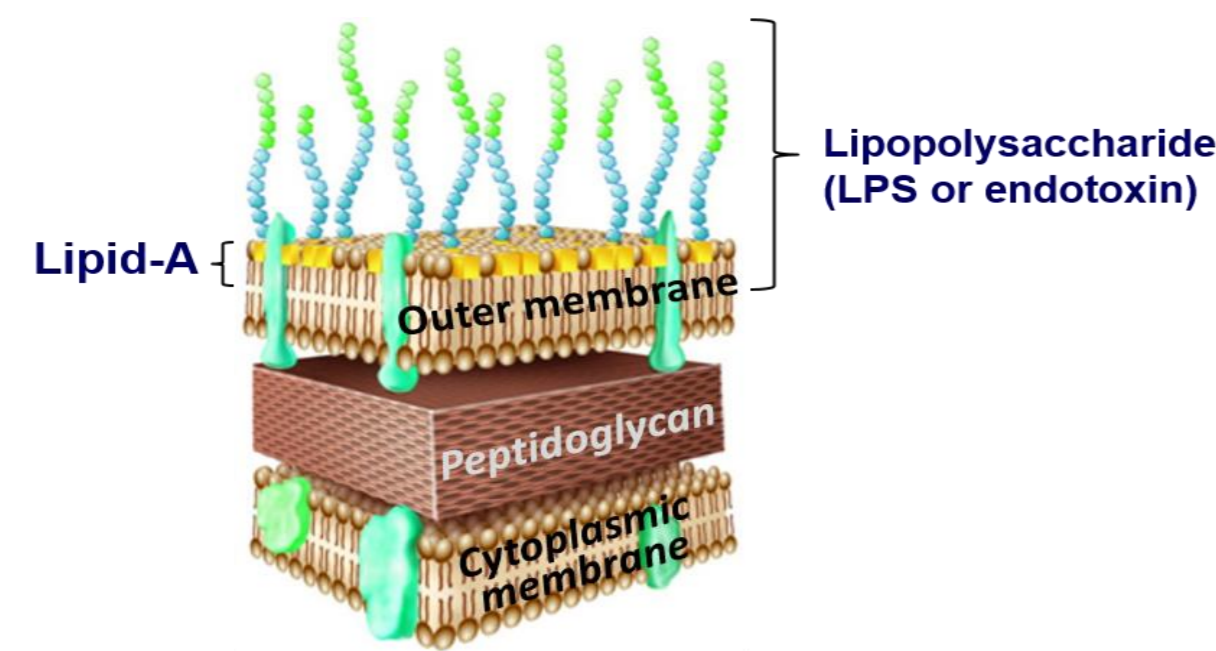


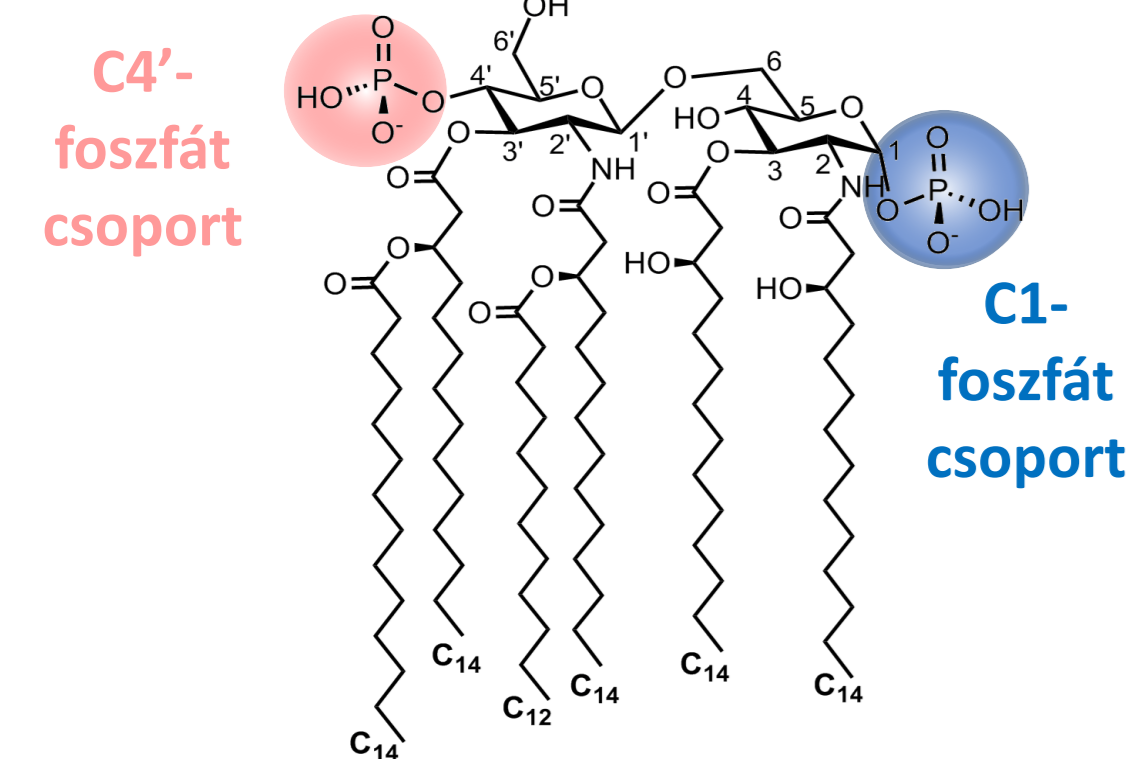
BEVEZETÉS

A Gram-negatív baktériumok felületét borító **endotoxinok**, melyek lipopoliszacharid típusú vegyületek, a **lipid A** részükkel ágyazódnak be a sejtmembránba (1. ábra). A véráramba jutva – például egy súlyos bakteriális fertőzés következményeként – **heves immunreakciót válthatnak ki** és potenciálisan halálos kimenetelű komplikációkat okozhatnak, mint az **endotoxikus sokk**, vagy a **szeepszis**.



1. ábra Gram-negatív baktériumok sejtfala

A lipid A elválasztása és szerkezeti jellemzése elengedhetetlenül nagy jelentőséggel bír az endotoxin által kiváltott immunreakciós folyamatok molekuláris hátterének megértésében. A biológiai eredetű lipid A kivonatok **heterogén keverékek** (akár egy tenyészetben belül is), a **foszforilációs pozíció** és az **acilációs mintázat** eltérései miatt. (2. ábra)



2. ábra Egy nagy toxicitású lipid A szerkezete

KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK

CE készülék: Agilent 7100 CE

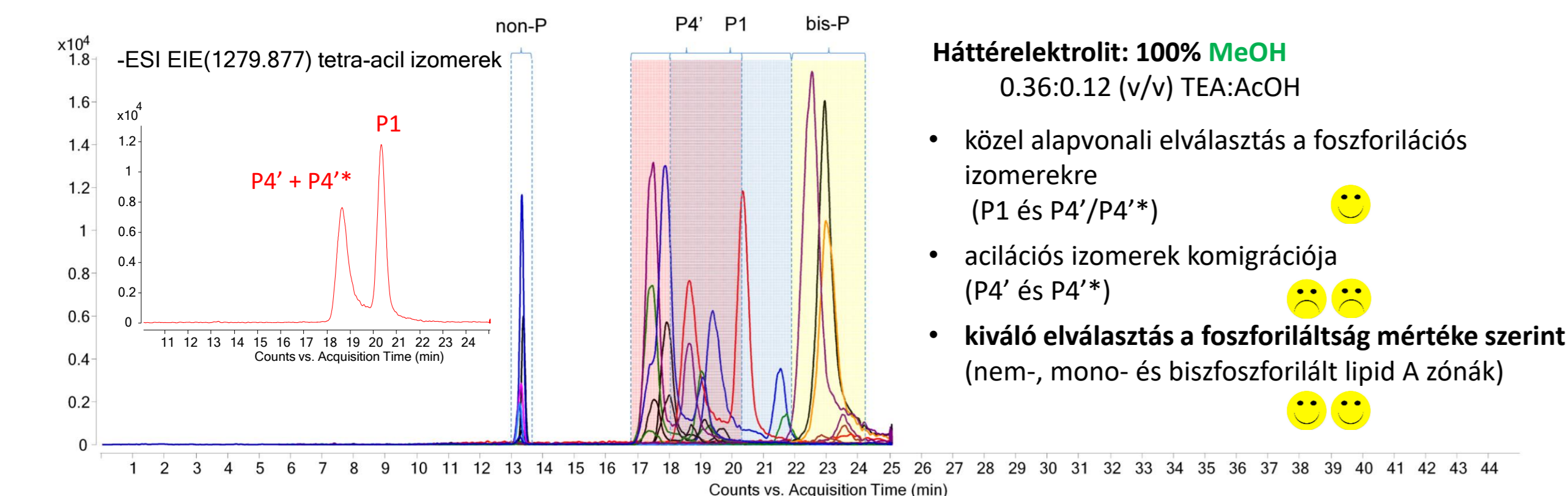
- **Kiegészítő oldat:** 100% metanol, 0.12% trietilamin (TEA), 0.04% ecetsav
- **Injektálás:** 50 mbar * 7 sec
- **Feszültség:** 30 kV
- **Polaritás:** normál és fordított
- **Kapilláris:** 55 cm x 50 µm, fedetlen
- **Hőmérséklet:** 20°C

ESI-MS/MS készülék: Agilent 6530 QTOF

- **ESI tú anyaga:** platina
- **ESI porlasztó feszültség:** 3 kV
- **Ionizációs módok:** pozitív és negatív
- **Porlasztógáz nyomása:** 15 psi
- **Száritógáz hőmérséklet és áramlás:** 200°C és 5L/min

EREDMÉNYEK

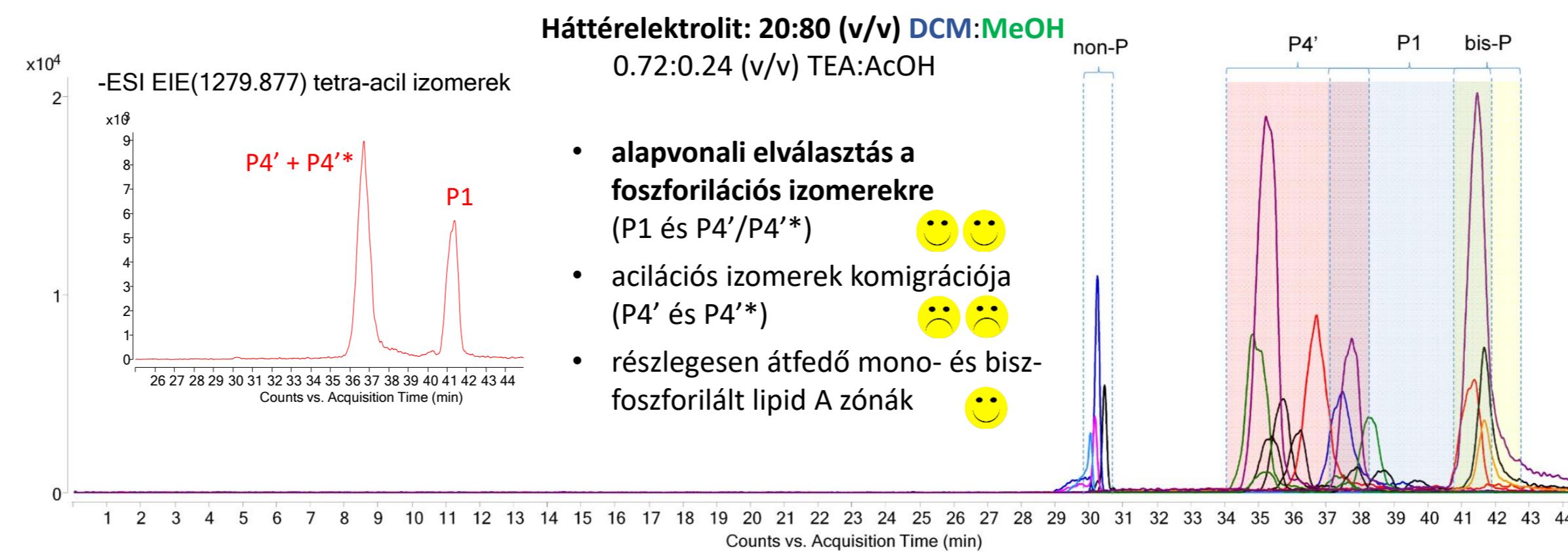
A lipid A izolátum alkotóinak változatosságát – úgymint a foszforilációs helyek és a kapcsolódó zsírsavláncok típusát – feltáróan kifejlesztettünk egy nyomással segített nemvizes kapilláris elektroforézis–tandem tömegspektrometriás (NACE-MS/MS) módszert.



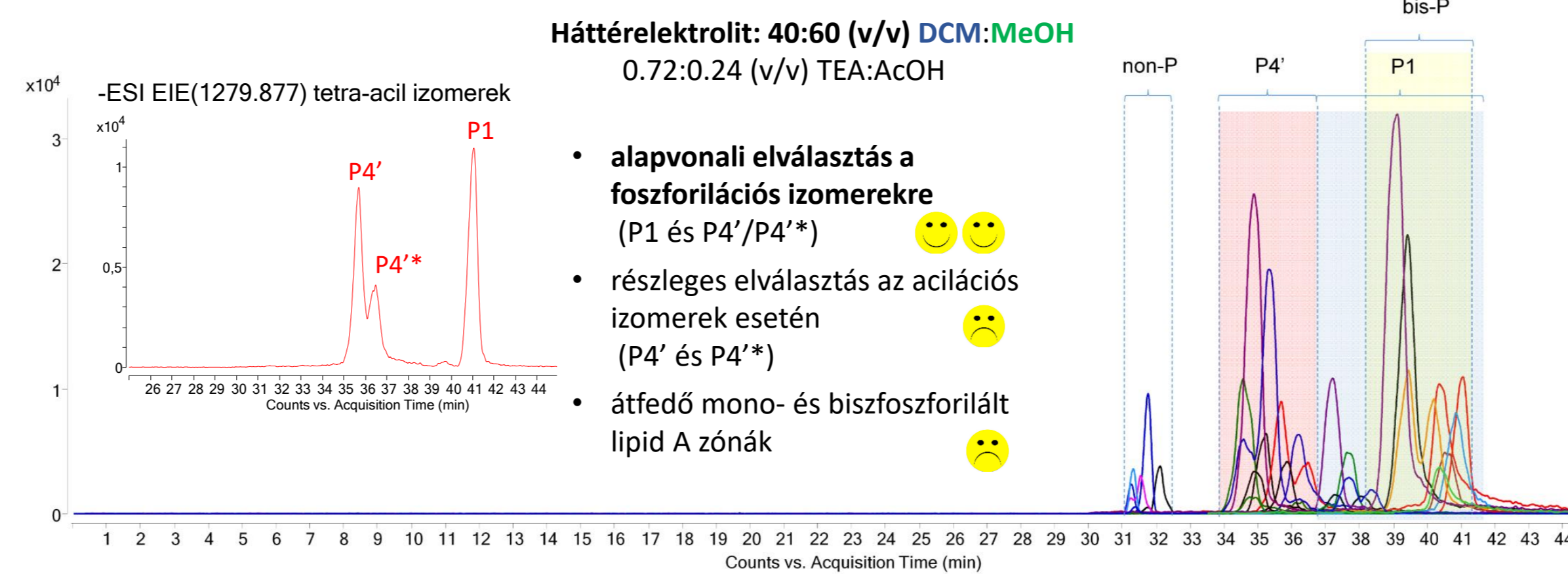
- Háttérelektrolit: 100% MeOH**
0.36:0.12 (v/v) TEA:AcOH
- közel alapvonal elválasztás a foszforilációs izomerekre (P1 és P4'/P4'*) 😊
 - acilációs izomerek komigrációja (P4' és P4'*) 😞
 - **kiváló elválasztás a foszforiláltság mértéke szerint** (nem-, mono- és biszfoszforilált lipid A zónák) 😊😊

Az alábbi paraméterek változtatásával követtük nyomon, hogy hogyan változik az **izobár foszforilációs és acilációs izomerek** elválasztásának hatékonysága és szelektivitása: (1) a háttérelektrolit diklórmétán tartalma, (2) a háttérelektrolit összes ecetsav és trietilamin tartalma, (3) a háttérelektrolitban lévő ecetsav és trietilamin aránya.¹

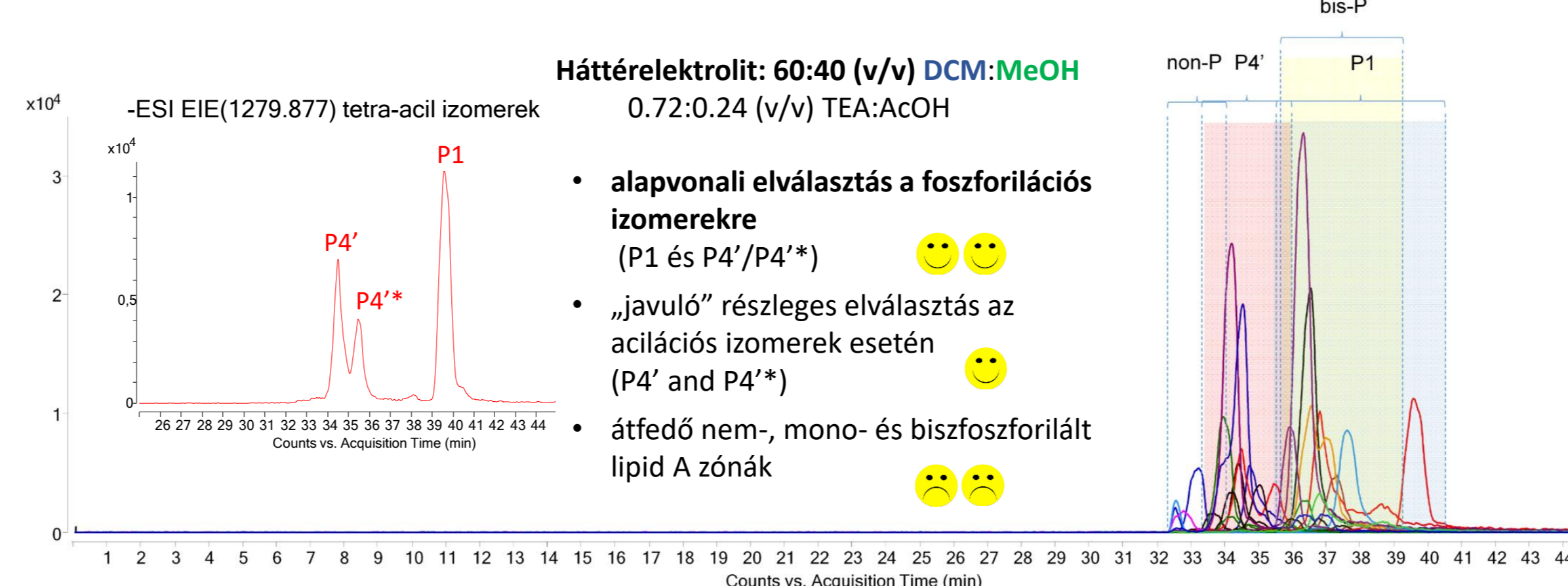
A háttérelektrolit szerves oldószer összetételét **normál CE polaritással** vizsgáltuk (**detektálás a katód oldalán történt**) (3. ábra):



- Háttérelektrolit: 20:80 (v/v) DCM:MeOH**
0.72:0.24 (v/v) TEA:AcOH
- **alapvonal elválasztás a foszforilációs izomerekre** (P1 és P4'/P4'*) 😊😊
 - acilációs izomerek komigrációja (P4' és P4'*) 😞
 - részlegesen átfedő mono- és biszfoszforilált lipid A zónák 😞



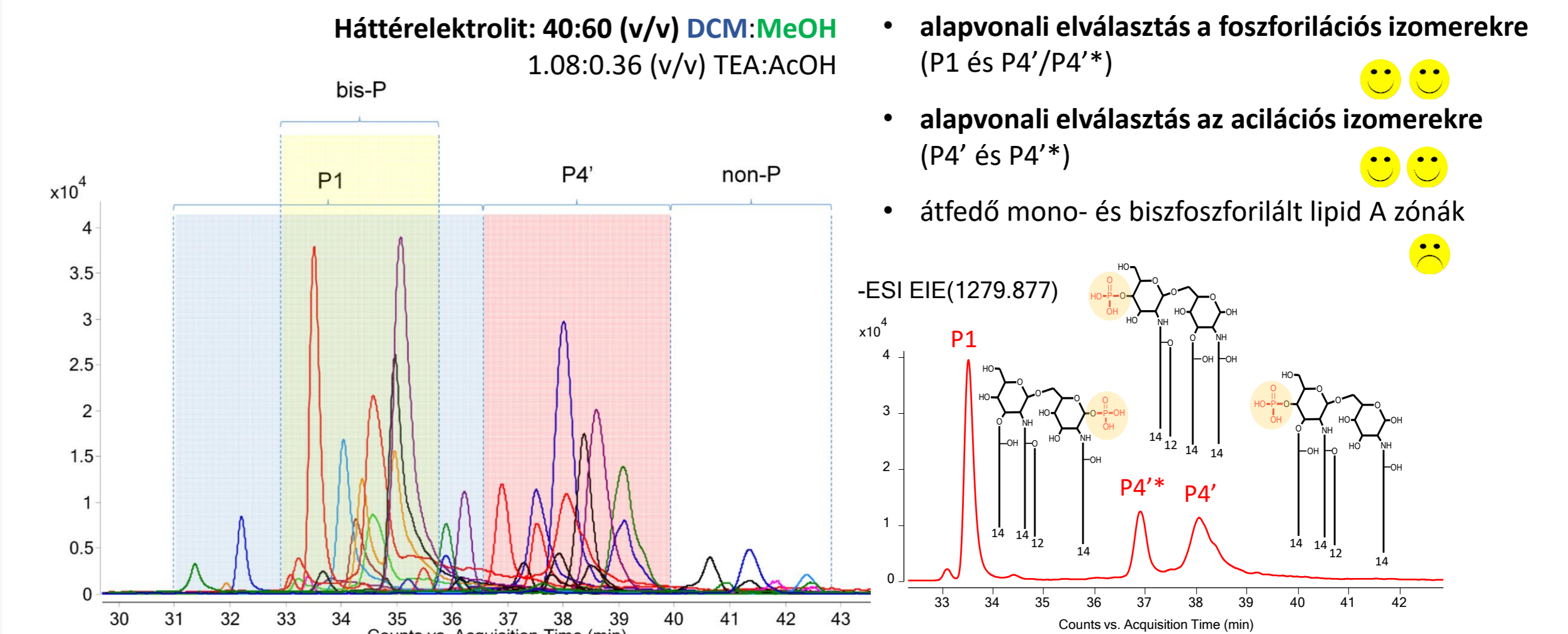
- Háttérelektrolit: 40:60 (v/v) DCM:MeOH**
0.72:0.24 (v/v) TEA:AcOH
- **alapvonal elválasztás a foszforilációs izomerekre** (P1 és P4'/P4'*) 😊😊
 - részleges elválasztás az acilációs izomerek esetén (P4' és P4'*) 😞
 - átfedő mono- és biszfoszforilált lipid A zónák 😞



- Háttérelektrolit: 60:40 (v/v) DCM:MeOH**
0.72:0.24 (v/v) TEA:AcOH
- **alapvonal elválasztás a foszforilációs izomerekre** (P1 és P4'/P4'*) 😊😊
 - „javuló” részleges elválasztás az acilációs izomerek esetén (P4' and P4'*) 😊
 - átfedő nem-, mono- és biszfoszforilált lipid A zónák 😞

3. ábra *Shigella sonnei* baktérium lipid A izolátumában jelenlévő komponensek NACE-ESI-QTOF MS mérésével kapott, egymásra fektetett, extrahált ion elektroferogramjai (EIE). Rásegítő nyomás: 0 min: 0 mbar, 30 min: 30 mbar. A beillesztett ábrákon a tetra-acilált monofoszforilált lipid A izomerek (m/z 1280) elválasztása látható. Jelölések: **bis-P:** biszfoszforilált lipid A, **P1:** C1-monofoszforilált lipid A, **P4' and P4'':** C4'-monofoszforilált lipid A acilációs izomerei, **non-P:** nemfoszforilált lipid A, TEA: trietilamin, AcOH: ecetsav, DCM: diklórmétán, MeOH: metanol

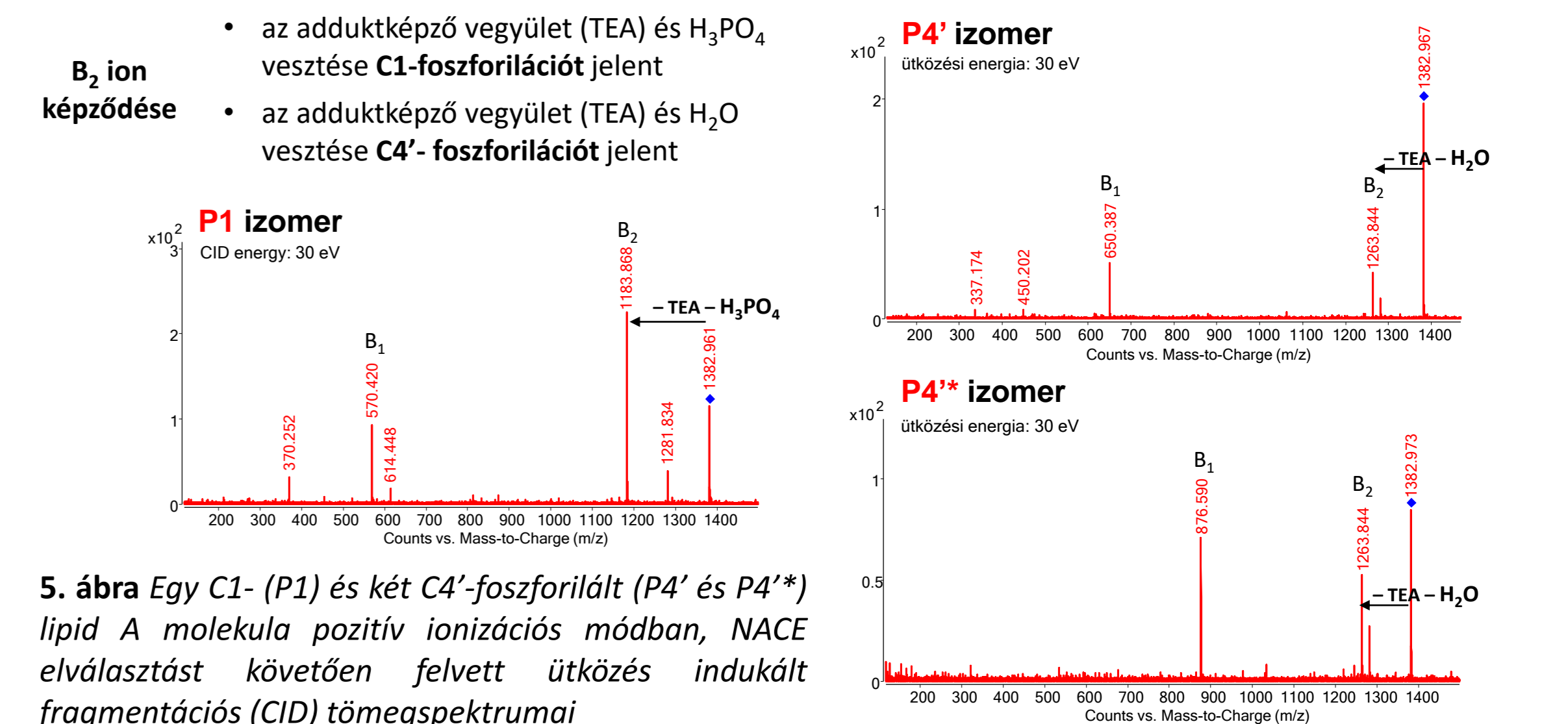
A háttérelektrolit összetételének és sókoncentrációjának optimalizálását követően, a méréseket **fordított CE polaritással** (**detektálás az anód oldalán**) és nyomás rásegítés (3 mbar) mellett is elvégeztük. A **4. ábrán** az egymásra fektett, extrahált ion elektroferogramok láthatóak. A katód felé irányuló EOF leküzdéséhez volt szükség a külső nyomás folyamatos alkalmazására.



- Háttérelektrolit: 40:60 (v/v) DCM:MeOH**
1.08:0.36 (v/v) TEA:AcOH
- **alapvonal elválasztás a foszforilációs izomerekre** (P1 és P4'/P4'*) 😊😊
 - **alapvonal elválasztás az acilációs izomerekre** (P4' és P4'*) 😊😊
 - átfedő mono- és biszfoszforilált lipid A zónák 😞

4. ábra *Shigella sonnei* baktériumból származó lipid A izolátumban jelenlévő komponensek NACE-ESI-QTOF MS mérésével kapott, egymásra fektetett, extrahált ion elektroferogramjai (EIE). Rásegítő nyomás: 0 min: 3 mbar, 30 min: 30 mbar. A beillesztett ábrákon a tetra-acilált monofoszforilált lipid A izomerek (m/z 1280) alapvonal elválasztása látható. A jelölések megegyeznek a 3. ábrán alkalmazott jelölésekkel

A pozitív ionizációs módban felvett tandem tömegspektrometriumok alapján egyértelműen meghatározható a lipid A komponensek foszforilációs mintázata. A fragmentáció során elsősorban B-típusú ionok keletkeznek: a glükózamin diszacharid C1 és C1' pozícióban jelenlévő glikozidos kötéseinek hasadásával B₁ és B₂ ionok jönnek létre.²



5. ábra Egy C1- (P1) és két C4'-foszforilált (P4' és P4'*) lipid A molekula pozitív ionizációs módban, NACE elválasztást követően felvett ütközési indukált fragmentációs (CID) tömegspektromai

ÖSSZEFOGLALÁS

Elsőször sikerült megvalósítani bakteriális eredetű lipid A izolátumban található C1- és C4'-monofoszforilált izomerek elválasztását és teljes szerkezetazonosítását nemvizes elektroforézis módszerrel és tandem tömegspektrometriás detektálással. Mivel az optimalizált módszer szelektivitása eltér a korábban kifejlesztett fordított-fázisú HPLC módszerétől,^{2,4} így a két csatolt technika kiválóan kiegészítheti egymást.

A lipid A közismert tulajdonsága, hogy a C1 és C4'-foszforilált izomerei eltérő módon aktiválják az immunrendszert. Kevés információ áll rendelkezésre ezek pontos mechanizmusáról és a természetes heterogenitás jelentőségéről, amely egyazon baktériumtenyészetben belül is megjelenik. Az orvosi biológiai kutatások emiatt számottevő figyelmet szentelnek az endotoxin szerkezetének megismerésére és a szeepszis kialakulásának pontosabb megértésére. Mindezek alapján az új NACE-MS/MS módszer hasznos eszköz lehet a foszforilációs izomerek egyértelmű azonosítására és azok emberre gyakorolt hatásainak felderítésére.

HIVATKOZÁSOK

- ¹ V. Sándor et al., *Electrophoresis*, 41, 1178-1188 (2020) ³ V. Sándor et al., *J Mass Spectrom*, 51, 615-628 (2016)
² V. Sándor et al., *J Mass Spectrom*, 53, 146-161 (2018) ⁴ V. Sándor et al., *J Mass Spectrom*, 51, 1043-1063 (2016)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatómunkát az NKFIH FK-129038, NKFIH K-125275 pályázatok és az ÜNKP-18-3-III az Emberi Erőforrások Minisztériumának Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával valósítottuk meg.

XXVI. Nemzetközi Vegyészkonferencia 2020

e-mail: peter.noveczky@aok.pte.hu