

XXXII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia
— Kémiai és Vegyipari Szekció —

Endotoxinok tömegspektrometriás meghatározása sejtszuszpenziókból

Péter Szandra

Kémia MSc.

Témavezető: Dr. Kilár Anikó tudományos munkatárs



Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Analitikai és Környezeti Kémia Tanszék

2014

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1 Gram-negatív baktériumok és az endotoxin.....	4
2.2. Az endotoxinok kémiai felépítése	5
2.3 Az endotoxinok biológiai hatásai	6
2.4 Az endotoxinok szerkezetvizsgálati módszerei.....	7
2.5 Endotoxinok meghatározása MALDI-TOF tömegspektrometriával.....	7
2.6 Endotoxinok mintaelőkészítése MALDI-TOF MS mérésekhez	10
3. CÉLKITŰZÉS	11
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	12
4.1 Vizsgált baktériumtörzsek és endotoxinok.....	12
4.2 Sejtszuszpenziók előállítása	12
4.3 „Sejtszuszpenzió LPS”-ek vizsgálata MALDI-TOF tömegspektrometriával	13
5.1 <i>E. coli</i> D31 sejtszuszpenzió MALDI-TOF MS analízise	14
5.2 <i>Salmonella minnesota</i> R595 sejtszuszpenzió MALDI-TOF MS analízise	17
5.3 <i>Shigella sonnei</i> 4350 és 41 sejtszuszpenzióinak MALDI-TOF MS analízise.....	20
5.4 <i>Shigella sonnei</i> 4303 sejtszuszpenzió MALDI-TOF MS analízise.....	25
5.5 Mátrixok hatásának vizsgálata	28
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	29
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	31
8. IRODALOMJEGYZÉK	32

1. BEVEZETÉS

„Az endotoxinok ellenállhatatlan molekulák. Úgy tűnik, a természet oly tökéletes arányban ruházta fel őket a jótékony és káros tulajdonságokkal, hogy a kutató csak egyet tehet: behódol nekik, és nekivág beható vizsgálatuknak.” Így nyilatkozott az 1970-es években Ivan L. Bennett kutatóorvos professzor azokról a komplex vegyületekről, amelyek a Gram-negatív baktériumok sejtfalának állandó alkotóelemei, függetlenül attól, hogy a baktérium patogén, vagy sem. Az endotoxinok kémiai lipopoliszacharid (rövidítve LPS) jellegű makromolekulák, és csak a baktérium pusztulása után fejtik ki hatásukat. Kettős biológiai hatással rendelkeznek: egyrészt az immunrendszer általános serkentői, másrészt a szepszis fő okozói. A szepszis egy klinikai tünetegyüttes, amely napjainkban is világszerte a vezető halálok az intenzív terápiás osztályokon.

Az endotoxinok megbetegítő képességének felfedezése óta sok kutatás irányul ma is a molekulák izolálására, tisztítására és kémiai szerkezet elemzésére. A pontos szerkezet felderítése nélkülözhetetlen az endotoxinok által kiváltott patofiziológiás folyamatok megértéséhez. Továbbá, az utóbbi években felmerült a kérdés, hogy – a fehérjeprofilhoz hasonlóan – vajon endotoxinprofil alapján is azonosíthatók-e egyes baktériumtörzsek.

Munkám során az endotoxinok szerkezeti elemzéséhez kidolgozandó új analitikai módszerek kutatásába kapcsolódtam be. Komplex vegyületek molekuláris szintű szerkezet felderítéséhez a mai modern analitikai módszerek közül elsősorban az NMR, a tömegspektrometria és a kapcsolt elválasztástechnikák eszköztára ad lehetőséget. A vizsgálatokhoz rendszerint tisztított LPS mintából indulnak ki, amit hosszas kivonási eljárással nyernek literes mennyiségű baktériumtenyészetből.

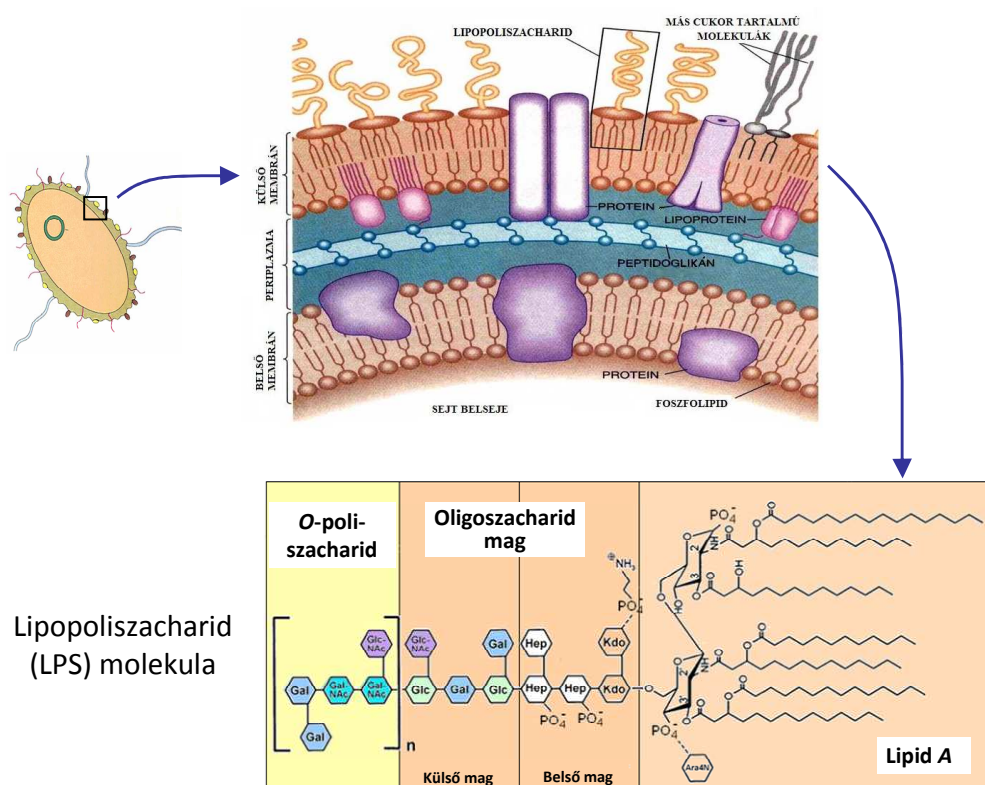
Munkám célja olyan tömegspektrometriás mintaelőkészítési eljárás kidolgozása volt, amellyel az intakt bakteriális LPS-ek közvetlenül vizsgálhatók mikroliteres térfogatú sejtszuspenziókból. Ily módon lényegesen egyszerűsödne és lerövidülne a szerkezetvizsgálatokat megelőző endotoxin kivonás módja és ideje, és a minta mennyiségét tekintve, akár klinikai vagy génmódosított baktérium minták gyors analízisére is alkalmas lehetne a módszer. Az irodalomban csupán néhány olyan próbálkozás található, ahol a szerkeztelemzést kis mennyiségű sejttenyészetből végzik.

Kísérleteim során MALDI-TOF tömegspektrometriát alkalmaztam adott baktériumokból származó tisztított és sejtszuspenziókban lévő endotoxinok detektálására, pontos lipid és poliszacharid összetevőinek meghatározására, tömegspektrometriás mintázatuk összehasonlítására.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Gram-negatív baktériumok és az endotoxin

A baktériumok többsége sejtfalszerkezetük alapján besorolhatók a Gram-pozitív vagy a Gram-negatív csoportokba, aszerint, hogy a Hans Cristian Joachim Gram dán orvos által kidolgozott sejtfestési eljárás során megfestődnek-e vagy sem (Gram, 1884). Endotoxint a Gram-negatív baktériumok (pl.: *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*) mindig, míg a Gram-pozitívak (pl.: *Lactobacillus*, *Streptococcus*) egyáltalán nem termelnek. Az endotoxint általában, mint a Gram-negatív baktériumok külső sejtfalát alkotó, lipopoliszacharid (LPS) jellegű makromolekulák keverékét definiáljuk (1. ábra). Az LPS-ek a lipid részükön keresztül kapcsolódnak a baktérium sejtfalához, míg poliszacharid láncaik kifelé mutatnak. A sejteket teljesen körülvevő LPS molekulák mintegy „merev páncélt” alkotva a baktériumok felszínén ellenállóvá teszik a baktériumot az emésztőnedvekkel, antibiotikumokkal szemben.



1. ábra A Gram-negatív baktériumok sejtfalának szerkezete és az endotoxin molekula.

Rövidítések: Gal=D-galaktóz, GalNAc=N-acetil-D-galaktózamin, Glc=D-glükóz, GlcNAc=N-acetil-D-glükózamin, Hep=L-glicero-D-manno-heptóz, Kdo=3-deoxi-D-manno-2-oktulonsav, Ara4N=4-amino-4-deoxi-L-arabinóz

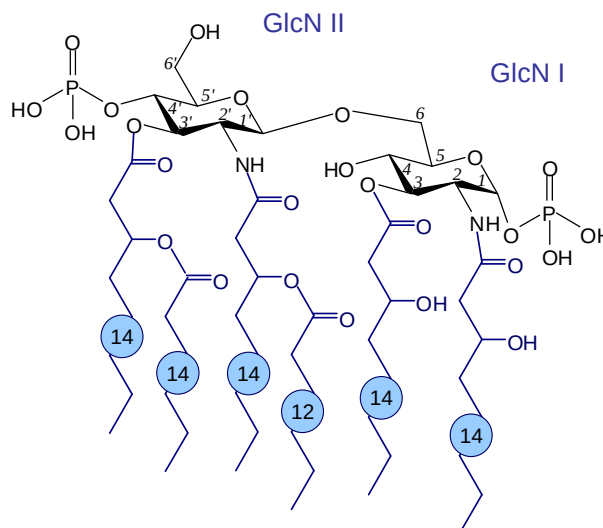
2.2. Az endotoxinok kémiai felépítése

Az LPS molekulát bakteriológiai, szerológiai, kémiai, genetikai és biológiai tulajdonságai alapján több szerkezeti egységre oszthatjuk (Caroff & Karibian, 2003). Az intakt LPS szerkezete három részre tagolódik, ahogy az 1. ábra is mutatja. Az egyes részek kovalens kötással kapcsolódnak egymáshoz. Ez az alapséma elsősorban a megbetegítő képességgel (fajlagos immunitással) is rendelkező S-típusú (S mint *smooth* = sima) törzsekre jellemző. A mutálódott baktériumok R-típusú (R mint *rough* = rücskös) endotoxinokat állítanak elő, amelyekből hiányzik az O-oldallánc.

1. O-specifikus oldallánc (O-poliszacharid): Ez a molekularész egy, a külvilág felé mutató ismétlődő egységekből összetevődő poliszacharid, mely jó antigén karakterrel rendelkezik (a szervezet antitesteket termel ellenük). Az alegységek 2-8 cukormolekulából állhatnak, a polimerizáltság fokára pedig egy adott törzs esetén is heterogenitás észlelhető (Nowotny és mts, 1990). Egy S-típusú endotoxin tehát különböző hosszúságú O-poliszacharid láncokat tartalmazó LPS komponensekből álló keverék. Az ismétlődő egységek monoszacharidjai között sokféle és sokszor ritka cukrok is, pl. dideoxihexózok, aminocukrok, aminouronsavak találhatók, melyek a fajlagos immunitásért felelősek.

2. Oligoszacharid mag (core): A core régió egy kevésbé változatos összetételű, belső és külső magra osztható oligoszacharid. **Külső mag:** különböző hexózokból áll, mint pl. D-glukóz (Glc), D-galaktóz (Gal), N-acetil-D-glükózamin (GlcNAc). Receptorként szolgál specifikus bakteriofágoknak, ugyanakkor R-mutánsoknál a mag ezen része felel a szerológiai specificitásért is. **Belső mag:** általában heptózt, valamint a nyolc szénatomos 2-keto-3-deoxioktulonsavat (Kdo) tartalmaz. Ez a cukormolekula néhány növényt kivéve, csak a baktériumokban fordul elő. A Kdo savlabilis ketozidos kötással (α -2-6') kapcsolódik a Lipid-A-hoz. Ezt kihasználva, enyhe savas hidrolízissel (pl. 1-2%-os ecetsav) magas hőmérsékleten a Lipid-A és a poliszacharid rész egymástól elválasztható.

3. Lipid-A: A lipopoliszacharid legbelső, egyben a legkevésbé variábilis része. A Lipid-A glukózaminból, foszfátcsoporthoz és zsírsavakból áll (2. ábra). A molekula vázát két foszforilált D-glukózamin (GlcN) képezi, szokatlan módon (β 1-6 kötésben) kapcsolódva egymáshoz. Erre a vázra, amid és észter kötással hosszú szénláncú zsírsavak kötődnek, leggyakrabban laurinsav (C12), mirisztinsav (C14), palmitinsav (C16), sztearinsav (C18) és β -hidroxilált származékaik. Az 1960-as évek végén tisztázódott, hogy az endotoxin lázkeltő, mérgező hatásáért a Lipid-A frakció felel (Nowotny és mts, 1990; Rietschel és mts, 1993).



2. ábra *E. coli*-típusú, legtoxikusabb Lipid-A kémiai szerkezete.
A körökben levő számok a zsírsavak szénatomszámát jelölik.

Az LPS molekulák amfifil jellegük miatt vizes oldatokban aggregálódnak. Az aggregálódást a kétértékű kationok (Ca^{2+} és Mg^{2+}) elősegítik (mivel intermolekuláris kötéseket alakítanak ki a Lipid-A foszfátcsoportjaival), a különböző felület aktív anyagok, EDTA, citromsav, illetve fehérjék pedig bontják. Egy endotoxin monomer molekulatömege 2-20 kDa között mozog.

2.3 Az endotoxinok biológiai hatásai

Az endotoxin vegyület emlős sejtek esetében rendkívül mérgező, a hétköznapi nyelven ismert vérmérgezés (szeptikémia) fő okozója, ám egyben az immunrendszer leghatásosabb modulátora is (Bertók, 2004). A normál bélflórát alkotó Gram-negatív baktériumokról, azok osztódása és növekedése során kis mennyiségben levált endotoxin az egész nyirok-és vérképző rendszer egyik legfontosabb serkentője. A bakteriális sejtfal szétesésekor (pl. lízis hatására) azonban nagy mennyiségű endotoxin szabadul ki a környezetbe, mely a véráramba kerülve számos, potenciálisan életveszélyes szövődmény forrása lehet. A patofiziológiai reakciók közé tartozik a magas láz, vérnyomás csökkenés, endotoxin sokk, és végső esetben halál is. A toxicitásban mutatkozó hatalmas különbség az LPS immunrendszert "aktiváló" képességének függvénye, ami szoros összefüggésben van a kémiai szerkezettel. Végeredményben maga az immunrendszer az, ami (túlzott citokin termelés hatására) a gazdaszervezetet elpusztítja és nem az LPS (Berczi, 2002).

Az endotoxint jelenleg kevesen ismerik annak ellenére, hogy a 2011-es orvosi Nobel-díjat az endotoxinnal kapcsolatos kutatómunkáért és felfedezésekért adták (Beutler, 2011).

2.4 Az endotoxinok szerkezetvizsgálati módszerei

Az endotoxinok részletes szerkezeti elemzése bonyolult feladatnak számít, hiszen az LPS molekulák amfifil jellege, továbbá az UV-elnyelő csoportok hiánya jelentősen megnehezíti vizsgálatukat a nagyhatékonyságú szerkezetvizsgáló módszerekkel. Rendszerint az LPS-ek enyhe savas hidrolízissel (Caroff és mts, 1988) nyert alkotóelemeit (oligo/poliszacharid részt vagy Lipid-A régiót) vizsgálják gázkromatográfiával (GC), mágneses magrezonancia spektroszkópiával (NMR) és lágy ionizációs tömegspektrometriával (MS). A kémiai degradáció közben azonban fennáll a veszély, hogy biológiailag fontos funkciós csoportok (pl. sav labilis cukrok, foszfoetanolamin, stb) elvesznek, továbbá laboratóriumi műtermékek (pl. részlegesen defoszforilált LPS komponensek) képződhetnek.

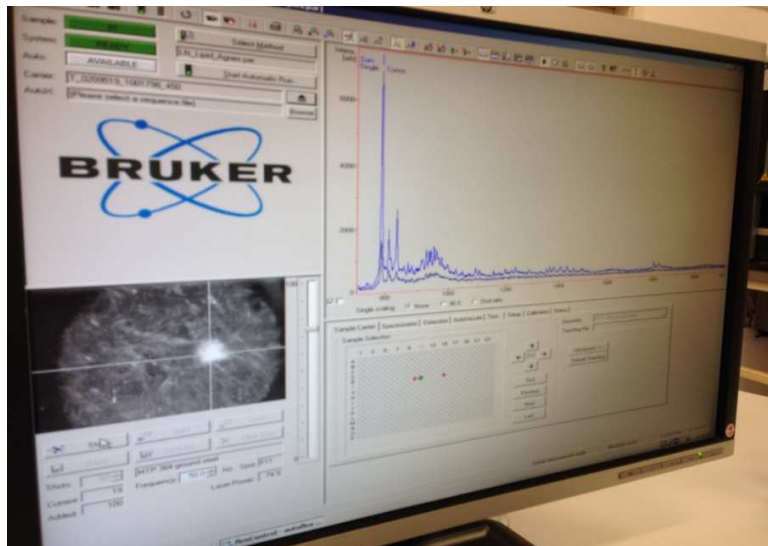
A legnagyobb kihívást az egyes endotoxin komponensek pontos összetételének megállapítása, a nem-sztöchiometrikus mennyiségben jelenlevő komponensek detektálása és a természetes heterogenitás feltérképezése jelentik. Az LPS makromolekulák szerkezetük alapján mindkét – a poliszacharid lánc és a lipid – rész változatossága miatt, fajon belül és kívül egyaránt rendkívüli módon heterogének. Ez adódhat a tenyésztési körülmények (pl. hőmérséklet, pH, stb) változásából, a LPS bioszintézisében résztvevő enzimek részleges működéséből, vagy külső környezeti tényezők hatásaira.

Intakt (nem degradált) LPS-ek közvetlen szerkezeti azonosítására a MALDI tömegspektrometriás módszerek a legalkalmasabbak (Kilár és mts, 2013). A következő fejezetben az endotoxinok MALDI-TOF tömegspektrometriás meghatározásáról nyújtok áttekintést.

2.5 Endotoxinok meghatározása MALDI-TOF tömegspektrometriával

A mátrix közvetítésével végzett lézer deszorpciós ionizáció (**matrix assisted laser desorption ionization**) MALDI MS technika mára már bevált módszer a lipid A és az intakt R-típusú endotoxinok analízisében (Therisod és mts, 2001; Sturiale és mts, 2005, Kilár és mts, 2011). Az intakt S-típusú LPS-ek vizsgálatában gyakran kihívást jelent, mert kevésbé ionizálható komponenseket is tartalmaz. A MALDI ionizációs technika a lágyionizációs módszerek közé tartozik, amellyel nagy molekulatömegű (akár több százezer daltonos) biomolekulák, biopolimerek, fehérjék tömegspektrometriás vizsgálata lehetséges. A mintát olyan mátrix oldatával kell összekeverni, mely az alkalmazott lézer hullámhosszánál fényelnyelést mutat. Ezt a minta/mátrix oldatot felcseppentjük a

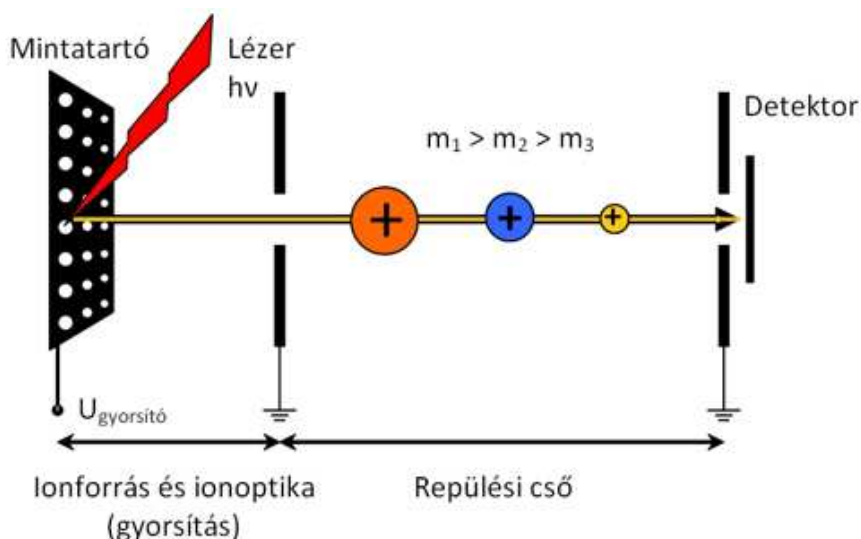
mintatartóra (ami általában rozsdamentes acél), majd levegőn hagyjuk megszáradni, hogy kristáleyalegyet képezzen. A száradás után a szilárd mikrokristályokat besugározzuk a lézer fénnel (3. ábra).



3. ábra A MALDI-TOF MS mérés szoftveres vezérlése. A beépített kamera segítségével irányíthatók a lézerimpulzusok az egyes kristály helyekre.

A jól szabályozható lézerforrásból származó gerjesztő energiát először a mátrix veszi fel és közvetíti a vizsgálandó molekulák felé (természetesen mindez nagyvákuumban történik). Ez a folyamat a minta deszorpciójához (elpárolgásához) és ionizációjához vezet. A képződő ionok lehetnek protonált $[M+H]^+$ vagy deprotonált $[M-H]^-$ kvázi-molekulaionok, emellett alkálifémekkel képzett kation adduktok ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+Na-2H]^-$, $[M+K-2H]^-$) is képződhetnek. Az LPS-eket a bennük található foszfátcsoportok deprotonálódása miatt legtöbbször negatív ionizációs módban szokás vizsgálni. A keletkezett ionokat azután egy nagy térerejű gyorsító rendszer (60-100 kV) továbbítja a **repülési idő (TOF: time of flight)** analizátor felé, ahol repülési idejük szerint elválnak. Az azonos kinetikus energiájú, de különböző tömegű ionok különböző sebességgel repülnek, és időben külön-külön érik el a detektort. A repülési idő egyszerű matematikai összefüggés segítségével átalakítható tömeg/töltés (m/z) aránnyá, így egy klasszikus tömegspektrumhoz juthatunk, ami a fajlagos tömeg függvényében ábrázolt ionintenzitás. A detektor fő feladata az, hogy az egyes ionok számával arányos intenzitású jelet szolgáltatson (pl. ion- vagy fotoszokszorozó detektor).

Előfordul, hogy az ionizáció nem egy időpillanatban történik és a keletkezett ionok energia eloszlása sem egyenletes, ekkor az azonos tömeggel rendelkező ionok nem azonos időben érik el a detektort, ami a csúcs szélesedését, azaz a felbontás romlását eredményezi. A lineáris üzemmódú TOF tehát (többnyire) nem alkalmas izotóp csúcsok felbontására, így a tömegspektrumról nem a monoizotópos, hanem az átlagos (relatív) molekulatömeget lehet leolvasni. Az izotópfelbontás akkor válik lehetővé, ha a TOF analizátort reflektoron üzemeltetési módban használjuk. Ilyenkor a detektor elé helyezett reflektoronba (iontükörbe = elektromos erőter) a gyorsabb ionok jobban, míg a lassúbb ionok kevésbé hatolnak be, így az azonos fajlagos tömegű ionok végül azonos időben érik el a detektort, megnő a felbontás. A reflektoron alkalmazhatóságának azonban határt szab a nagy molekulák (pl. LPS) vizsgálata. Az intakt endotoxinok széles tömegtartományának analíziséhez ezért a lineáris módot alkalmaztam, melynek működési elvét a 4. ábra szemlélteti.



4. ábra A lineáris TOF analizátor működési elve. A MALDI ionforrásban impulzusszerűen előállított ionok az U gyorsítófeszültség hatására belépnek az erőtermentes repülési csőbe, ahol fajlagos tömegük alapján elkülönülnek.

A MALDI módszer egyik legérzékenyebb pontja megtalálni az adott mintához megfelelő szerves mátrix anyagot. Az irodalom többféle mátrixot javasol az endotoxinok vizsgálatára, mint pl. citromsavban oldott, 2,5- dihidroxi-benzoészav (DHB) (Thérisod és mts, 2001), metanolban oldott 2',4',6'-trihidroxi-acetofenon (THAP) (Sturiale és mts, 2005), vagy kloroform/metanol/víz 4:4:1 arányú elegyében oldott 5-kloro-2-mercaptobenzotiazol (CMBT) telített oldatait (Zhou és mts, 2010). A mátrix abban az

esetben nyújthat megfelelő ionizálást, amennyiben kellően homogén kristályfelszínt alkot a MALDI plate felszínén.

2.6 Endotoxinok mintaelőkészítése MALDI-TOF MS mérésekhez

A LPS-ek szerkezeti elemzéséhez rendszerint nagy tisztaságú, por alakú, fehérje- és nukleinsavmentes endotoxin mintákat állítanak elő. Az S-típusú baktériumokból az LPS-eket forró fenol/vizes extrakcióval (Westphal és mts, 1952), míg az R-típusú baktériumokból fenol/kloroform/petroléteres extrakcióval (Galanos és mts, 1969) vonják ki. Mindkét módszer egyszerű lépésekből áll (extrahálás, ultracentrifugálás, dializálás, liofilezés), azonban rendkívül hosszadalmas (5-10 nap).

Kis mennyiségű, részlegesen tisztított endotoxin kivonására a rövid ideig tartó (kb. 40 óra), mindössze 1 ml baktérium-tenyészetet igénylő sejtlizátumos módszert alkalmazzák, lizozim és proteináz K enzimek alkalmazásával (Hitchcock & Brown, 1983). Korábbi kutatómunkámban a MALDI-TOF tömegspektrometria alkalmazhatóságát vizsgáltam a sejtlizátumokból kinyert endotoxinok jellemzéséhez (Péter, 2012). A szakirodalomban ilyen jellegű vizsgálatokra csak elvétve található példa (Therisod és mts, 2001).

Az endotoxin kivonása mellett, a tömegspektrometriás mérést közvetlenül megelőző mintaelőkészítésnek szintén alapvető jelentősége van a kísérlet kimenetelére nézve. Egyrészt, a minta/mátrix arány pontos megállapítása mindig kísérletes munkát igényel. Másrészt, a mintához különböző szennyezőkből származó fémionok, elsősorban nátrium- és káliumionok kapcsolódhatnak, melyek nem kívánatos kísérőcsúcsként jelenhetnek meg a tömegspektrumon. Az endotoxin kutatók épp ezért az 1:1 minta/mátrix arány, és az LPS minták előzetes sóalanítását (pl. Dowex kationcserélő gyantával Parafilmen[®] kivitelezve) (Sturiale és mts, 2005), illetve citromsavas oldását javasolják (a citromsav növeli az LPS oldékonyságát) (Therisod és mts, 2001).

Pályamunkámban több újszerű kísérletet hajtottam végre, melyek során pár telepből előállított, mikroliteres mennyiségű sejtszuspenziók LPS tartalmának detektálhatóságát és jellemzését tanulmányozom MALDI-TOF tömegspektrometriával. A szakirodalomban közvetlenül baktériumsejtből származó endotoxinok MS vizsgálatára nem található példa.

3. CÉLKITŰZÉS

A Pécsi Tudományegyetem Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetében nagy mennyiségben vannak ki endotoxint különböző baktériumokból, mint például az *Enterobacteriaceae* családba tartozó *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* és *Salmonella minnesota* baktériumokból. Az *E. coli* törzsek a normál bélflórában is megtalálhatók, patogén törzsei súlyos hasmenéses, húgyúti és egyéb extraintestinális megbetegedéseket okozhatnak. A *Shigella* genusba tartozó *S. sonnei* a bakteriális vérhas okozója, míg a *Salmonella* baktériumok emberi és állati patogének, súlyos hasmenéssel és kiszáradás járó betegséget okoznak. Munkám során ezekkel az enterális patogén csoportba tartozó törzsekkel foglalkoztam.

Pályamunkám során célul tűztük ki a különböző enterobakteriális baktériumok, mindössze pár baktériumtelepből előállított sejtszuspenzióiból származó endotoxinjainak tömegspektrometriás detektálását és heterogenitás vizsgálatát. Célunk volt a hosszú endotoxin kivonási eljárás helyett olyan új módszer kidolgozása és optimalizálása tömegspektrometriás analízishez, melyet majd a későbbiekben a klinikumban, illetve az endotoxin kutatás más területén (pl. génmódosított baktérium minták vagy epidemiológiai vizsgálatoknál) alkalmazni tudnak. A „sejtszuspenzió LPS” minták tömegspektrumait minden esetben összehasonlítottam a hosszadalmas endotoxin kivonási eljárásokkal kapott, nagy tisztaságú LPS minták tömegspektrumával. A detektált ioncsúcsokhoz tartozó elemi összetételek hozzárendelése is kitűzött feladat volt. A kísérlet 5 R-típusú baktérium mintára terjedt ki:

- *E. coli* D31
- *Salmonella minnesota* R595
- *Shigella sonnei* 4303 (a vad típusú *S. sonnei* fázis I. spontán mutánsa)
- *Shigella sonnei* 41 és 4350 (a *S. sonnei* 4303 indukált mutáns törzsei)

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Vizsgált baktériumtörzsek és endotoxinok

A vizsgálathoz használt baktériumtörzsek az R-típusú *Escherichia coli* D31, *Shigella Sonnei* 4350, 41, 4303 és *Salmonella minnesota* R595 voltak. A törzsek a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetének saját törzsgyűjteményéből származtak. A *S. sonnei* 4303 (másnéven fázis II.) a vad típusú törzs (*S. sonnei* fázis I.) virulencia plazmidot vesztett spontán mutánsa (Péterfi, 2007). A *S. sonnei* 41 és 4350 törzseket a 4303 törzsből származtatták etil-metán-szulfonáttal indukált mutációval. Az egyes törzseket húslé-agar táptalajt tartalmazó Petri-csészére szélesztettük. Az egyes törzsekből származó tisztított R-típusú endotoxinok (az *E. coli* D31-et kivéve) előzetes fenol-kloroform-petroléteres (Galanos és mts, 1969) extrakciót követően, liofilizált formában álltak rendelkezésemre.

4.2 Sejtszuspenziók előállítása

A sejtszuspenzióból származó LPS minták előállításához alapvetően három elképzelésünk volt, melyek a következő lépésekből álltak:

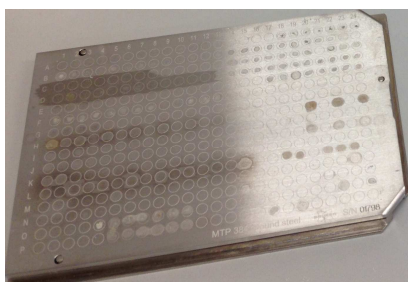
- az első esetben a vizsgált baktériumtörzseket Petri-csészén tenyésztett izolált baktériumtelepekből (10-15 telep), steril kacs segítségével átoltottam 3 ml Mueller-Hinton bouillon táptalajt (húslé) tartalmazó kémcsőbe. A kémcsöveket egy éjszakán át 37°C-os rázótermosztátba helyeztem. A baktériumtenyészetből 1,5 ml-t Eppendorf csőbe pipettáztam, és centrifugálás (3 perc, 6000×g) után a felülúszót leöntöttem, majd a kémcsőben levő maradék tenyészetmintával ismét végrehajtottam ezt a lépést ugyanabban az Eppendorf csőben. A baktériumot tartalmazó üledékhez 1 ml desztillált vizet adtam, Vortex segítségével felfuszpendáltam és újra lecentrifugáltam. A vizes mosási lépést háromszor ismételt meg. A mintákat 30 percig 100°C-on termosztáltam fűtőblokkban, így **„bouillon” sejtszuspenzió** mintákhoz jutottunk. A mintaelőkészítési eljárás az egy éjszakás tenyésztéssel együtt 24 órát, azaz **1 napot** vett igénybe.

- a második eljárás során a vizsgált baktériumtörzseknek egy másik Petri-csészén tenyésztett izolált baktériumtelepeiből, steril kacs segítségével 3-6 telepét 150 µl desztillált vizet tartalmazó Eppendorf csőbe szuszpendáltam, majd a mintákat 30 percig 100°C-on termosztáltam fűtőblokkban. Az így kapott **„hőkezelt telep” sejtszuspenzió** minták előkészítése tehát kb. **30 percet** vett igénybe.

- a harmadik sejtsuszpenzió előállításakor az előzőhöz hasonlóan, ugyanazon a Petri-csészén tenyésztett izolált baktériumtelepekből, steril kacs segítségével 3-6 telepet 150 µl desztillált vizet tartalmazó Eppendorf csőbe szuszpendáltam, de ennél az eljárásnál nem alkalmaztam hőkezelést. Így jutottam a „**telep**” **sejtsuszpenzió** mintákhoz mindössze **5 perc** mintaelőkészítéssel.

4.3 „Sejtsuszpenzió LPS”-ek vizsgálata MALDI-TOF tömegspektrometriával

A liofilizált LPS mintából 1 mg/ml-es vizes oldatot készítettem. Az egyes sejtsuszpenzió és a liofilizált mintákból 1 µl-t összekevertem 1 µl 0,1M citromsavval. felvett vagy Dowex 50WX8-200 (NH₄⁺) kationcserélő gyantán sótalanítottam, a kétértékű kationok eltávolítása végett. Ehhez 5 µl ioncserélő gyantát pipettáztam egy Parafilm® darabkára, majd 5 µl LPS mintát pipettáztam hozzá, és a pipetta hegyével összekevertem. A gyantaszemcsék leülepedése után a csepp tetejéről 0,5 µl-t cseppentettem fel a tömegspektrometriás mintahordozó (5. ábra) egy meghatározott pontjára, amelyre közvetlenül előtte 0,5 µl mátrix oldatot is felvittem. Mátrixként 2',4',6'-trihidroxiacetofenon (THAP) telített oldatát (20mg/ml) ACN:H₂O, (1:1, v/v%) keverékében oldva, vagy 2',5'-dihidroxibenzoesav (DHB) telített (10 mg/ml) citromsavas oldatát használtam. Az összekevert cseppet hagytam megszáradni/együttkristályosodni. A tömegspektrometriás analízist Bruker autoflex II. MALDI-TOF/TOF MS tömegspektrométeren végeztem, lineár módban. Az LPS ionokat negatív ionizációs módban detektáltam, 900-5000 *m/z* tartományban. Az ionizációt 337 nm hullámhosszúságú nitrogén lézerrel végeztem 65-75 % lézerenergiával. A tömegspektrumok 500 eredményét összesítve készültek. A mérési paraméterek beállításához a FlexControl 2.4, az adatok kiértékeléséhez a Bruker FlexAnalysis 2.4 szoftvert használtam. A készüléket külső kalibrálással, egy Peptid kalibrációs standard segítségével kalibráltam. A tömegspektrumok kiértékelését az endotoxinok szerkezetét felépítő ismert cukor, foszfát és zsírsav molekulák átlagos molekulatömegeinek összegzésével végeztem.

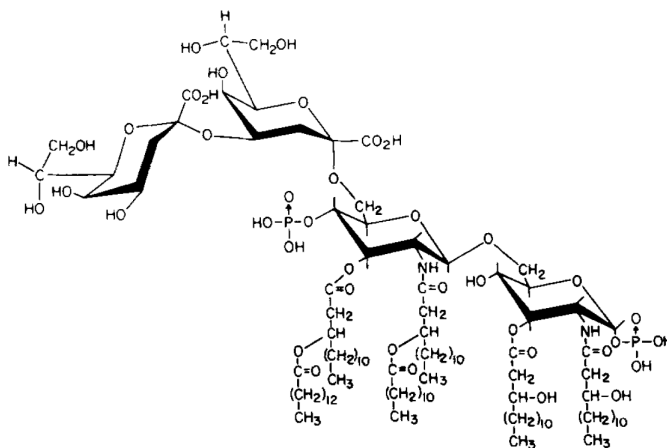


5.ábra A MALDI-TOF MS mérésekhez használt rozsdamentes acélból készült mintatartó

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1 *E. coli* D31 sejtszuspenzió MALDI-TOF MS analízise

Az *E. coli* D31 törzsből nem állt rendelkezésemre tisztított LPS minta, azonban az endotoxin szerkezete korábbi tanulmányokból pontosan ismert (6. ábra) (Qureshi és mts, 1988). Ezt a fajta LPS-t gyakran használják biológiai kísérletekhez, mert viszonylag nagy homogenitású (90%-ban hexa-acilált, biszfoszforilált forma), lipid szennyezőktől mentes endotoxin preparátum készíthető belőle (Kutuzova és mts, 2001).

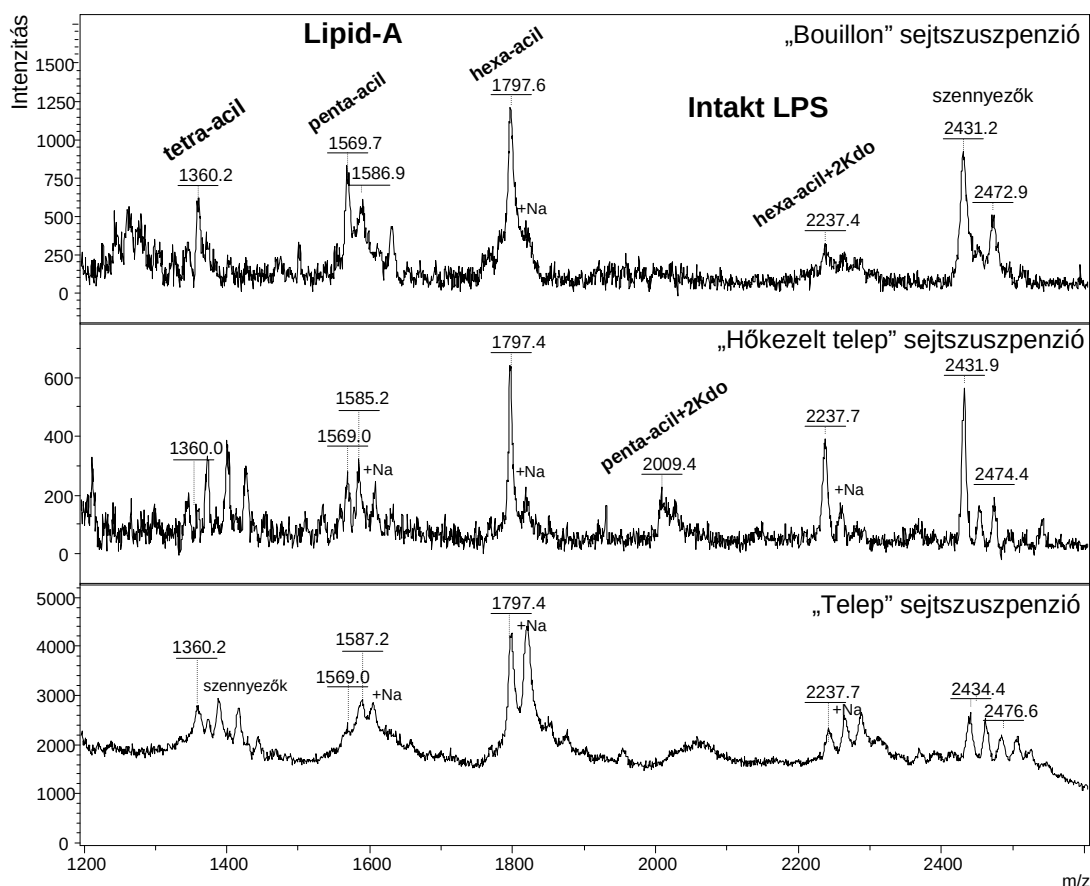


6. ábra Az *E. coli* D31 intakt endotoxin teljes szerkezete

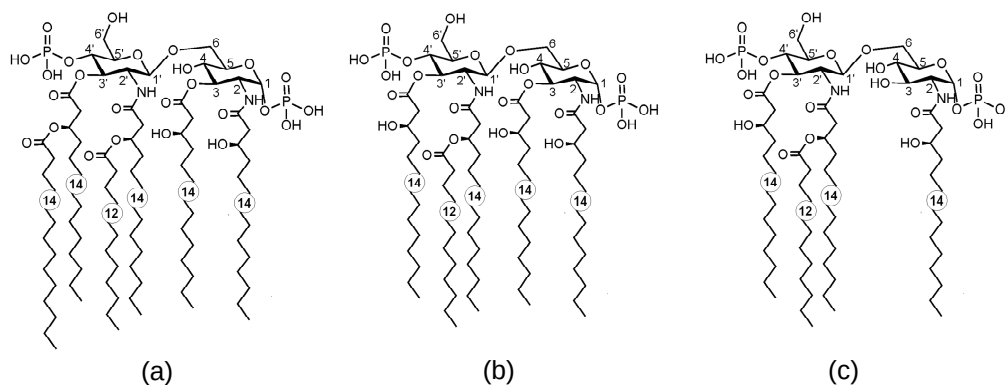
Kísérleteimben MALDI-TOF tömegspektrométert alkalmazva, Petri-csészén tenyésztett *E. coli* D31 telepekből, teljesen újszerű mintaelőkészítésekkel (ld. Anyagok és módszerek, 4.2 alfejezet) előállított sejtszuspenziókat vizsgáltam. Az egyes tenyészet szuszpenziók tömegspektrumai a 7. ábrán láthatók. A spektrumok alapján mindenekelőtt elmondható, hogy mindhárom mintaelőkészítési módszer alkalmasnak bizonyult az endotoxin karakterisztikus csúcsainak detektálásához, ezáltal a D31 R-LPS szerkezetvizsgálatához. Az egyes sejtszuspenziók előállítását tekintve tehát rendre 1 nap, 30 perc, de akár 5 perc alatt is, pusztán hő- és vizes kezelés hatására, sikerült az endotoxint olyan mértékben kiszabadítani a baktériumok sejtfalából, ami a tömegspektrometriás detektáláshoz elegendő volt.

Mindhárom tömegspektrumon csúcshalmazok formájában jelentek meg az intakt R-LPS és a külön Lipid-A-ra jellemző $[M-H]^-$ kvázi-molekulaion csúcsok (és néhány esetben azok $[M+Na-2H]^-$ addukt ionjai is), melyek egy foszfátcsoport deprotonálódásával keletkeztek. A csúcshalmazok egyrészt az endotoxin természetes heterogenitását tükrözik, másrészt az ionforrásban lejátszódó fragmentációból is erednek. Az endotoxin molekulák a tömegspektrométer ionforrásában ugyanis kis gerjesztési energia hatására is hasadnak a

Lipid-A és a core oligoszacharid közti glikozidos kötés mentén, melynek eredményeként megjelennek külön az intakt LPS ionjai és a Lipid-A fragmensionjai, különböző aciláltsági fokkal (8. ábra). Az eltérő acilációs fok szintén eredhet az LPS eredeti heterogenitásából és az ionforrásban lejátszódó fragmentációból (a Lipid-A cukormolekulája és az ahhoz kapcsolódó zsírsavak közti kötések szintén hasadhatnak a tömegspektrométerben).



7. ábra *E. coli* D31 R-LPS sejtuszpenziókból felvett negatív ion, lineár mód MALDI- TOF tömegspekttrumok



8. ábra Hexa- (a), penta- (b) és tetra-acilált (c) Lipid A komponensek

Az *E. coli* D31 sejtsuszpenziókban detektált ioncsúcsokhoz tartozó LPS komponensek kémiai összetételét a 2. táblázat foglalja össze. Az egyes ionokhoz tartozó elemi összetétel meghatározásakor a következőképpen jártam el (valamennyi általam vizsgált endotoxin esetében). Összegyűjtöttem az ismert szerkezetű endotoxinokat felépítő egységeket (zsírsavak, cukrok, foszforsav, stb), majd meghatároztam összegképletüket és kiszámoltam a relatív (átlagos) tömegüket. Ezeket az 1. táblázatban adtam meg. Majd az egyes alkotókat összeadva, az összes lehetséges Lipid-A és core oligoszacharid kombinációból felépítettem egy adatbázist, és a kapott összetételekhez tartozó tömegeket összehasonlítottam a tömegspektrumról leolvasható tömegekkel. Az intakt LPS-ek és Lipid-A-k lehetséges összetételeinek megalkotásakor minden esetben egy diglukózamin vázból indultam ki, és ezt a vázat kezdtem el elméletben szubsztituálni a 2 és 3, illetve 2' és 3' szénatomokhoz kapcsolódó hidroxil-, illetve aminocsoportokon különböző β -hidroxi-zsírsavakkal, majd ezek hidroxil-csoportjait további zsírsavakkal. Az 1 és 4' szénatomokhoz hozzáadogattam a foszfátcsoportokat, a 6' szénatomhoz pedig a core részt alkotó cukormolekulákat. Az elméleti m/z értékek számolásánál két dolgot kellett figyelembe vennem: 1) n db molekula összekapcsolódásakor a tömeg $n-1$ db víz molekula tömegével lesz kevesebb, és 2) a tömegspektrumban deprotonált molekulák fajlagos tömegét látjuk, tehát a végső számértékekből mindig levontam egy proton tömegét.

1. táblázat Az endotoxint felépítő molekulák átlagos molekulatömegei

Név	Rövidítés	Összegképlet	Átlagos molekulatömeg	Átlagos molekulatömeg – H ₂ O
<u>Zsírsavak</u>				
Laurilsav	C12	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200.32	182.30
Mirisztinsav	C14	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228.37	210.35
Hidroximirisztinsav	C14(3-OH)	C ₁₄ H ₂₈ O ₃	244.37	226.35
Telítetlen mirisztinsav	C14(telítetlen)	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	226.36	208.34
Palmitinsav	C16	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.42	238.40
<u>Cukor molekulák</u>				
Glükózamin	GlcN	C ₆ H ₁₃ NO ₅	179.16	161.14
Glükóz	Glc	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	162.14
Galaktóz	Gal	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	162.14
Heptóz	Hep	C ₇ H ₁₄ O ₇	210.18	192.16
2-keto-3-deoksioktoniksav	Kdo	C ₈ H ₁₄ O ₈	238.19	220.17
4-amino-4-deoxi-arabinóz	Ara4N	C ₅ H ₁₁ NO ₄	149.15	131.13
Foszfoetanolamin	PEtN	C ₂ H ₈ NO ₄ P	141.06	123.04
<u>Foszforsav</u>	P	H ₃ PO ₄	98.00	79.98
<u>Víz</u>	-	H ₂ O	18.02	

2. táblázat Az *E. coli* D31 R-LPS tömegspektrumain megjelenő $[M-H]^-$ kvázimolekulaionok m/z értékei, a hozzá tartozó elméleti (számított) m/z értékek, és az egyes tömegszámokhoz rendelt LPS komponensek kémiai összetétele.

<u>Lipid-A</u> <u>acilációs fok</u>	<u>Elemi összetétel*</u>	<u>Számított</u> <u>m/z</u>	<u>Kísérleti m/z</u>		
			Bouillon- sejtszuszpenzió	Hőkezelt telep- sejtszuszpenzió	Telep- sejtszuszpenzió
<i>Lipid-A</i>					
Tetra-acil	3xC14(3-OH), 1xC12, 2xP	1360.7	1360.2	1360.0	1360.2
Penta-acil	3xC14(3-OH), 1xC14(telítetlen), 1xC12, 2xP	1569.0	1569.7	1569.0	1569.0
Penta-acil	3xC14(3-OH), 1xC14, 1xC12, 2xP	1587.0	1586.9	1585.2	1587.2
Hexa-acil	4xC14(3-OH), 1xC14, 1xC12, 2xP	1797.4	1797.6	1797.4	1797.4
<i>Lipid-A+Kdo</i>					
Penta-acil	3xC14(3-OH), 1xC14(telítetlen), 1xC12, 2xP, 2Kdo	2009.4	-	2009.4	-
Hexa-acil	4xC14(3-OH), 1xC14, 1xC12, 2xP, 2Kdo	2237.7	2237.4	2237.7	2237.7

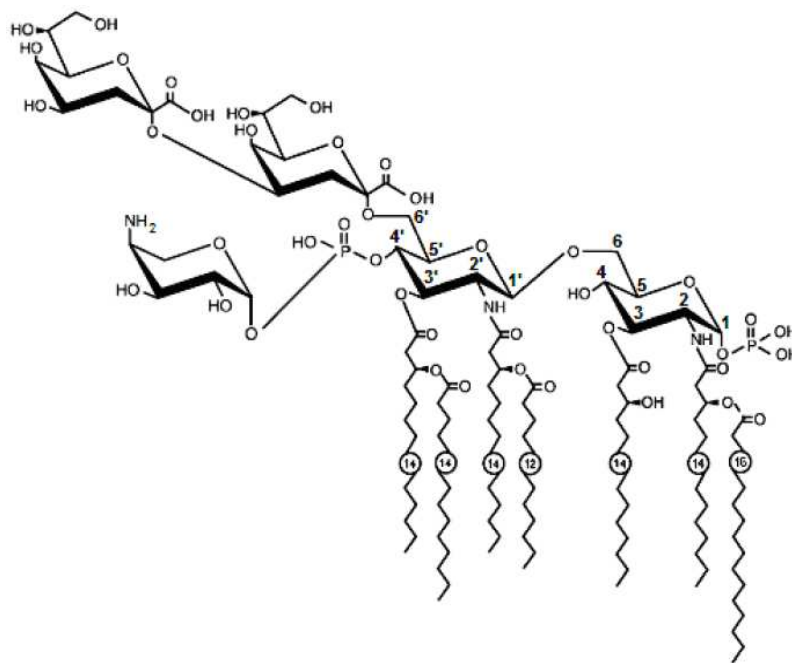
* minden Lipid-A-t tartalmazó komponens tartalmaz egy diglükózamin vázat is. Rövidítések: P=foszfát csoport, C14(3-OH)= β -hidroximirisztinsav, C14=mirisztinsav, C12=laurilsav, C14(telítetlen)=egyszeresen telítetlen mirisztinsav, Kdo=2-keto-3-deoxi-oktulonsav.

Összefoglalva, valamennyi általam vizsgált endotoxin esetében a számolt tömegértékek és a tömegspektrumokról leolvasott tömegértékek összehasonlításával következtettem arra, hogy az adott Lipid-A, core vagy intakt R-LPS összetétele megegyezik-e azzal, amit feltételezek. Fontos azonban megemlíteni, hogy a lineáris TOF tömegpontossága nem elegendő ahhoz, hogy egyértelműen azonosítani lehessen az ionösszetételeket. A minden kétséget kizáró igazoláshoz az egyes kiválasztott ionokat fragmentálni kellene tandem tömegspektrometriával, azonban ilyen jellegű kísérleteket egyelőre nem végeztem.

5.2 *Salmonella minnesota* R595 sejtszuszpenzió MALDI-TOF MS analízise

A *Salmonella minnesota* R595 baktérium endotoxinjának szerkezete az irodalomból szintén jól ismert (9. ábra) (Brandenburg és mts, 2003). Annyiban különbözik az *E. coli* D31 endotoxin szerkezetétől, hogy Lipid-A-ja tartalmaz egy 16 szénatom hosszúságú, telített szekunder zsírsavat is, valamint az egyik foszfátcsoporthoz egy aminoarabinóz cukor molekula is kapcsolódik. Az aminoarabinóz a baktérium szempontjából igen fontos funkciócsoport, mely pozitív töltése révén védeltséget ad a kationos antimikrobiális peptidek támadásai ellen (Moskowitz és mts, 2004). Ismeretes, hogy a Gram-negatív

baktériumok akár külső stressz faktorok hatására is képesek módosítani a felszínüket, hogy csökkentsék a felszíni negatív töltések számát, ezáltal növeljék az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájukat. Ilyen módosító funkciós csoportjuk még a foszfoetanolamin (Kawasaki és mts, 2009).

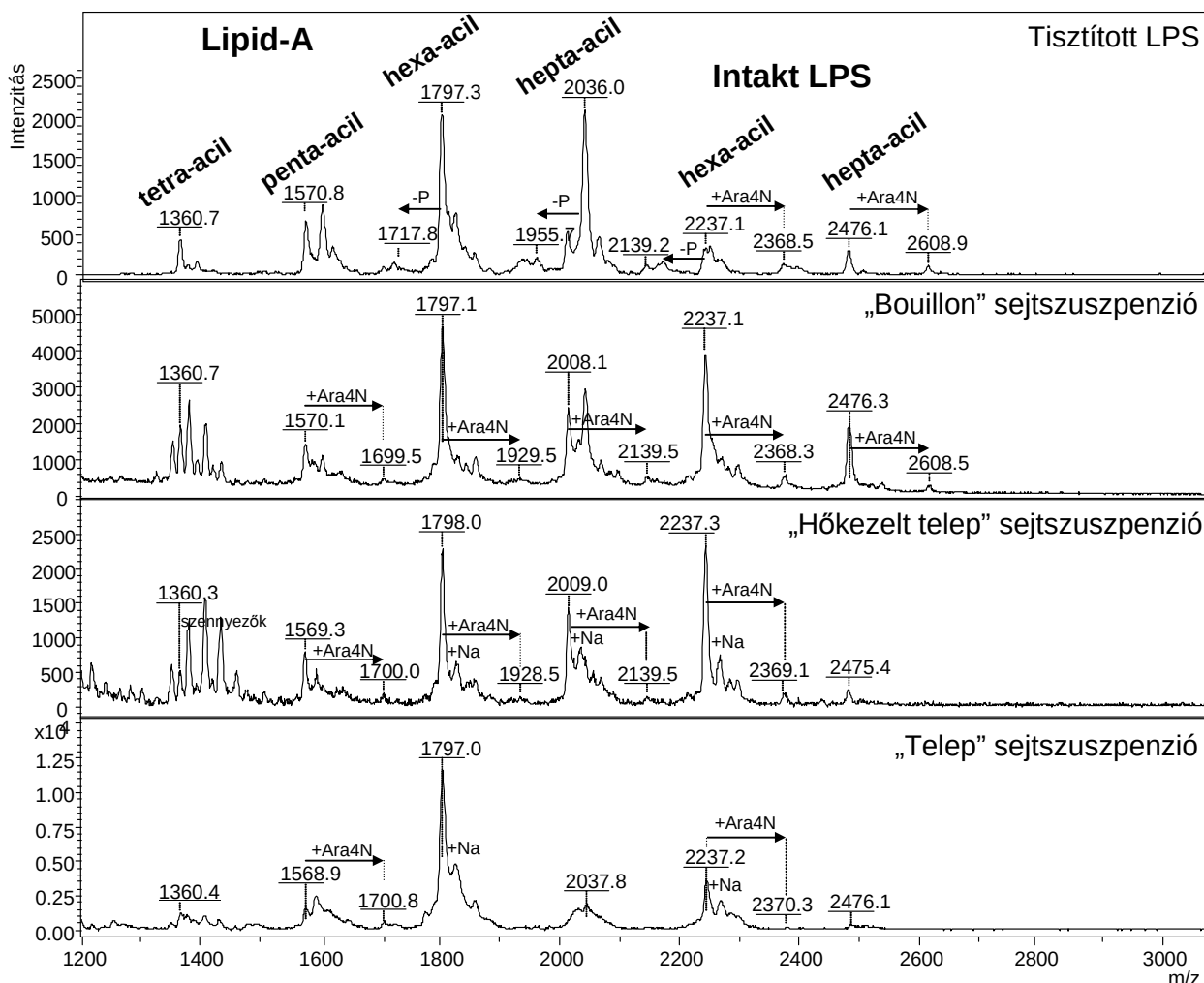


9. ábra A *Salmonella minnesota* R595 LPS teljes szerkezete

Kísérleteimben a *Salmonella minnesota* R595 törzsből származó tisztított LPS, és a három sejtszuszpenzió MALDI-TOF tömegspektrometriás mérését végeztem el. Ezek eredményei a 10. ábrán láthatók. Valamennyi mintában megjelentek az LPS-re jellemző, karakterisztikus kvázi-molekulaion csúcsok (és néhol a Na-adduktok is), és a négy tömegspektrum nagyfokú hasonlóságot mutat a LPS heterogenitására vonatkozóan. Néhány észrevehető különbség a tisztított és a szuszpenzió minták között, hogy az $m/z=2237$ tömegszámmal jellemzett, hexa-acilált intakt R-LPS ioncsúcsa a tisztított LPS minta esetén kevésbé intenzív (valószínűleg a tisztítás során ez a komponens részben elbomolhatott), valamint, hogy a tisztított mintában nemcsak biszfoszforilált, hanem monofoszforilált Lipid-A és intakt LPS ioncsúcsok is megjelennek. A Bouillon-, és a telep-tenyészet szuszpenziók spektrumai közötti fő különbség, hogy a telep-minták esetében nem látható a teljes szerkezetű (hepta-acilált), intakt LPS aminoarabinóz tartalmú ioncsúcsa ($m/z=2608$ körül).

Összességében elmondható, hogy a *S. minnesota* R595 endotoxinról az újonnan kifejlesztett mintaelőkészítésekkel, a folyékony (bouillon) szuszpenzió esetében teljes értékű, míg a telep-tenyészet szuszpenziók esetében közel teljes értékű MALDI-TOF tömegspektrumokat sikerült felvennem. A detektált tömegszámokhoz tartozó Lipid-A és LPS komponensek kémiai összetételét a 3. táblázat tartalmazza.

Ha a táblázatból megfigyeljük az amino-arabinóz tartalamú ioncsúcsok összetételét, láthatjuk, hogy olyan összetételű komponensek is vannak, melyek csak Lipid-A+Ara4N-ből állnak. Ebből következtethetünk arra, hogy az aminoarabinóz molekula nem a core oligoszacharidban található Kdo-hoz kapcsolódik, hanem a Lipid-A-ban található, valamelyik foszfátcsoport szubsztituenseként van jelen.



10. ábra A *Salmonella minnesota* R595 tisztított és sejtuszuszpenziókból felvett R-LPS negatív ion, lineár mód MALDI- TOF tömegspektrumai

3. táblázat A *Salmonella minnesota* R595 LPS tömegspektrumain megjelenő $[M-H]^-$ kvázimolekulaionok m/z értékei, a hozzá tartozó elméleti (számított) m/z értékek, és az egyes tömegszámokhoz rendelt LPS komponensek kémiai összetétele.

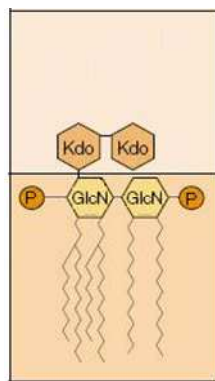
<u>Lipid-A</u> <u>acilációs fok</u>	<u>Elemi összetétel*</u>	<u>Számított</u> <u>m/z</u>	<u>Kísérleti m/z</u>			
			Tisztított LPS	Bouillon- sejtszuszpenzió	Hőkezelt telep- sejtszuszpenzió	Telep- sejtszuszpenzió
Lipid-A						
Tetra-acil	3xC14(3-OH), 1xC12, 2xP	1360.7	1360.7	1360.7	1360.3	1360.4
Penta-acil	3xC14(3-OH), 1xC14(telítetlen), 1xC12, 2xP	1569.0	1570.8	1570.1	1569.3	1568.9
Hexa-acil	4xC14(-OH), 1xC14, 1xC12, 1P	1717.4	1717.8	-	-	-
Hexa-acil	4xC14(3-OH), 1xC14, 1xC12, 2xP	1797.4	1797.3	1797.1	1798.0	1797.0
Hepta-acil	4xC14(-OH), 1xC14, 1xC12, 1xC16, 1P	1955.8	1955.7	-	-	-
Hepta-acil	4xC14(-OH), 1xC12, 2xC14, 2P	2007.7	-	2008.1	2009.0	-
Hepta-acil	4xC14(-OH), 1xC12, 1xC14, 1xC16, 2P	2035.8	2036.0	-	-	2037.8
Lipid-A + aminoarabinóz						
Penta-acil	3xC14(3-OH), 1xC14(telítetlen), 1xC12, 2xP, 1xAra4N	1700.1	-	1699.5	1700.0	1700.8
Hexa-acil	4xC14(3-OH), 1xC14, 1xC12, 2xP, 1xAra4N	1928.5	-	1929.5	1928.5	-
Hepta-acil	4xC14(-OH), 2xC14, 1xC12, 2P, 1xAra4N	2138.9	2139.2	2139.5	2139.5	-
Lipid-A + Kdo						
Hexa-acil	4xC14(-OH), 1xC14, 1xC12, 2P, 2 Kdo	2237.7	2237.1	2237.1	2237.3	2237.2
Hepta-acil	4xC14(-OH), 1xC14, 1xC12, 1xC16, 2P, 2 Kdo	2476.2	2476.1	2476.3	2475.4	2476.1
Lipid-A + Kdo + aminoarabinóz						
Hexa-acil	4xC14-OH, 1xC14, 1xC12, 2P, 2 Kdo, 1xAra4N	2368.9	2368.5	2368.3	2369.1	2370.3
Hepta-acil	4xC14-OH, 1xC14, 1xC12, 1xC16, 2P, 2 Kdo, 1xAra4N	2607.3	2608.9	2608.5	-	-

* minden Lipid-A-t tartalmazó komponens tartalmaz egy diglükózamin vázat is.
Rövidítések: P=foszfát csoport, C14(3-OH)= β -hidroxi-mirisztinsav, C14=mirisztinsav, C12=laurilsav, C14(telítetlen)=egyszeresen telítetlen mirisztinsav, Kdo=2-keto-3-deoksi-oktulonsav, Ara4N=4-amino-4-deoxi-L-arabinóz

5.3 *Shigella sonnei* 4350 és 41 sejtszuszpenzióinak MALDI-TOF MS analízise

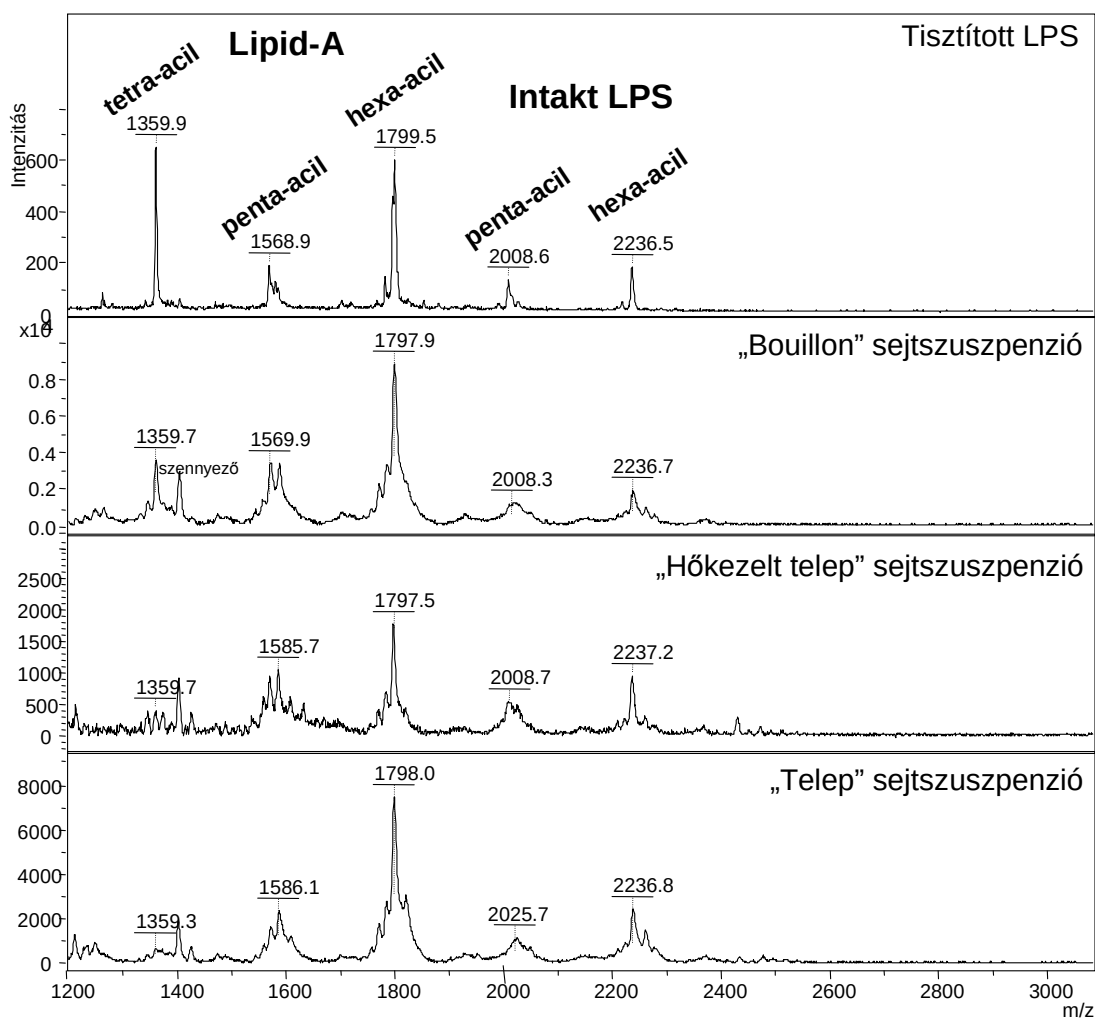
A *S. sonnei* 3450 és 41 baktériumok a 4303 törzsből származtatott izogenikus mutánsok. A bennük található Lipid-A szerkezete ugyanaz, míg a core részükben eltérnek egymástól.

A *S. sonnei* 3450 egy heptóz-transzferáz-hiányos mutáns (Kocsis & Kontrohr, 1984), így endotoxinjának core oligoszacharid része csak Kdo egységekből áll (11. ábra). A *S. sonnei* 3450 tisztított és sejtszuszpenzió endotoxinjainak MALDI-TOF tömegspektrometriás eredményei a 12. ábrán láthatók.



11. ábra A *Shigella sonnei* 4350 endotoxinok vázlatos szerkezete.

Rövidítések: GlcN=N-acetil-D-glükózamin, Kdo= 3-deoxi-D-manno-2-oktulonsav,
P=foszfát



12. ábra *Shigella sonnei* 4350 tisztított és sejtuszpenziókból felvett R-LPS

negatív ion, lineár módú MALDI- TOF tömegspektrumai

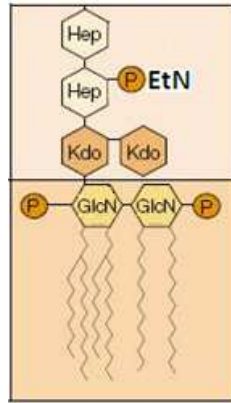
Mind a négy tömegspektrumon láthatóak különböző aciláltságú Lipid-A és az intakt R-LPS-re jellemző, karakterisztikus ioncsúcsok (a tisztított LPS minta esetén kicsit jobb felbontással). Ez azt jelenti, hogy egy napos, de akár pár perces mintaelőkészítéssel, pár telepből kiindulva is teljes értékű tömegspektrumot tudtam felvenni erről az endotoxinról. A különböző aciláltsági fokú Lipid-A kvázi-molekulaionok intenzitásában különbség mutatkozik a tisztított és sejtszuszpénzió minták között: a tisztított LPS tömegspektrumán a tetra-acilált Lipid-A lényegesen nagyobb intenzitással jelenik meg. Ez arra utalhat, hogy ez a komponens a tisztítási folyamat során keletkezhetett nagyobb mennyiségben, és eredetileg csak kis mennyiségben volt jelen a baktériumban. A sejtszuszpénzió mintákról felvett tömegspektrumokon látható intenzitás arányok valószínűleg hűebben tükrözik az LPS minta természetes heterogenitását, a Lipid-A eredeti aciláltsági fokát. Az egyes tömegszámokhoz tartozó R-LPS komponensek kémiai összetételét a 4. táblázat foglalja össze.

4. táblázat A *S. sonnei* 4350 LPS tömegspektrumain megjelenő $[M-H]^-$ kvázi-molekulaionok m/z értékei, a hozzá tartozó elméleti (számított) m/z értékek, és az egyes tömegszámokhoz rendelt LPS komponensek kémiai összetétele.

<u>Lipid-A</u> <u>acilációs fok</u>	<u>Elemi összetétel*</u>	<u>Számított</u> <u>m/z</u>	<u>Kísérleti m/z</u>			
			Tisztított LPS	Bouillon- sejtszuszpenzió	Hőkezelt telep- sejtszuszpenzió	Telep- sejtszuszpenzió
<i>Lipid-A</i>						
Tetra-acil	3xC14(3-OH), 1xC12, 2xP	1360.7	1359.9	1359.7	1359.7	1359.3
Penta-acil	3xC14(3-OH), 1xC14, 1xC12, 2xP	1569.0	1568.9	1569.9	1585.7	1586.1
Hexa-acil	4xC14(3-OH), 1xC14, 1xC12, 2xP	1797.4	1799.5	1797.9	1797.5	1798.0
<i>Lipid-A +Kdo</i>						
Penta-acil	3xC14(3-OH), 1xC14, 1xC12, 2Kdo, 2xP	2007.7	2008.6	2008.3	2008.7	-
Hexa-acil	4xC14(3-OH), 1xC14, 1xC12, 2Kdo, 2xP	2237.7	2236.5	2236.7	2237.2	2236.8

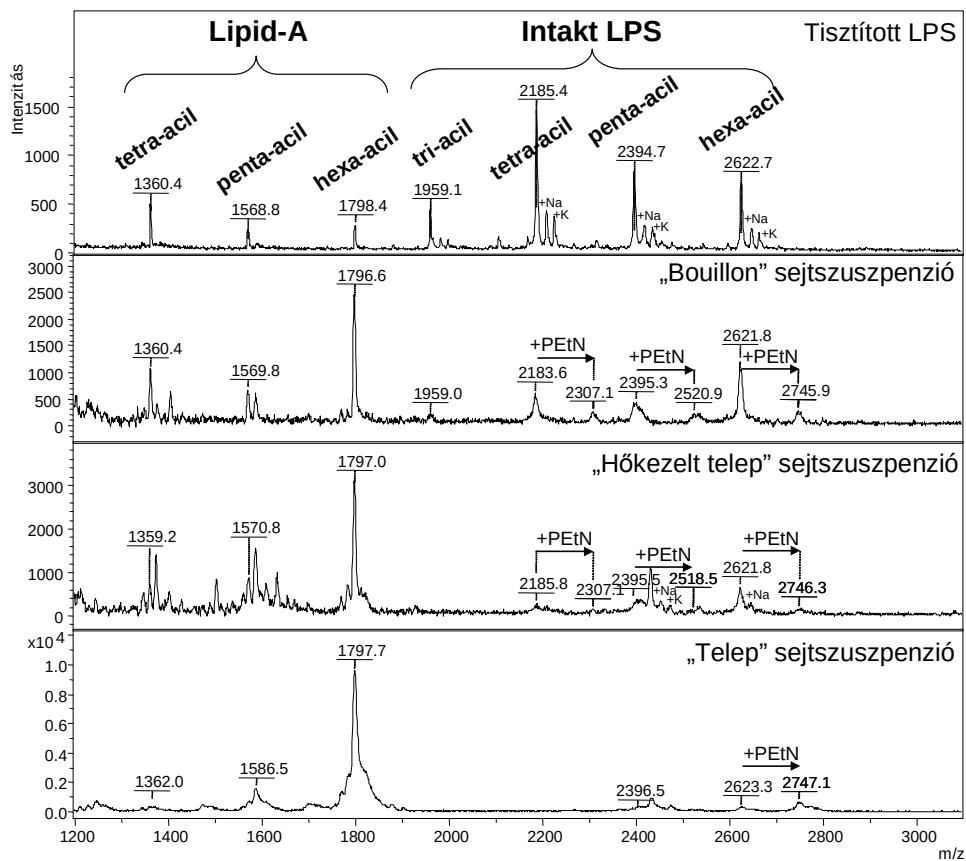
* minden Lipid-A-t tartalmazó komponens tartalmaz egy diglükózamin vázat is. Rövidítések: P=foszfát csoport, C14(3-OH)= β -hidroxi-mirisztinsav, C14=mirisztinsav, C12=laurilsav, C14(telítetlen)=egyszeresen telítetlen mirisztinsav, Kdo=2-keto-3-deoksi-otulonsav.

A *Shigella sonnei* 41-es R-típusú mutáns baktérium endototoxinjából hiányzik a külső core oligoszacharid, és csak a belső core-ra jellemző cukrokat tartalmazza (13. ábra). Erről az LPS-ről a sejtszuszpénziókból felvett tömegspektrumok a 14. ábrán láthatók.



13. ábra A *Shigella sonnei* 41 endotoxinok vázlatos szerkezete.

Rövidítések: GlcN=N-acetil-D-glükózamin, Hep=L-glicero-D-manno-heptóz, Kdo= 3-deoxi-D-manno-2-oktulonsav, P=foszfát, PEtN=foszfoetanolamin

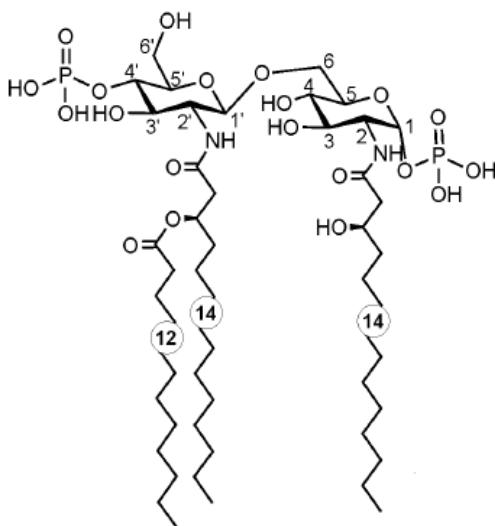


14. ábra *Shigella sonnei* R41 tisztított és sejtuszpenziókból felvett R-LPS negatív ion, lineár mód MALDI- TOF tömegspektrumai

A *S. sonnei* 41-es mintánál a telep-sejtuszpenziókban nem, míg a tisztított és a bouillon-sejtuszpenzió mintákban megjelent egy teljes belső core régiót tartalmazó, tri-acilált intakt R-LPS ioncsúcsa is. A kiindulási (hexa-acilált) szerkezet alapján, a három

zsírsavat tartalmazó *S. sonnei* Lipid-A szerkezetében a diglukózamin vázhoz egy C14 acil és egy C14(3-O-C12) aciloxi-acil lánc kapcsolódik 2 illetve 2' amid kötésben (15. ábra). Korábban már bizonyították (Silipo és mts, 2008), hogy az észter kötésű zsírsavakkal szemben az amid kötésű zsírsavak nem, vagy csak igen ritkán hasadnak le (pl. MSⁿ kísérletek hatására, ahol n>3).

Egy másik érdekesség, hogy a tisztított R-LPS mintához képest a sejtszuszpenzió mintákban olyan intakt endotoxinra jellemző ioncsúcsok is megjelentek, amelyek egy, a baktérium szempontjából fontos csoportot, azaz foszfoetanolamint (PEtN) tartalmaznak. A baktérium felszínén található foszfoetanolamin csoportok befolyásolják a sejtfal permeabilitását és szerepet játszanak a baktérium antibiotikum rezisztenciájának kialakításában. Ez a funkciós csoport a többszörös extrahálással kinyert tisztított LPS-ben nem volt detektálható MALDI-TOF tömegspektrometriával. A PEtN nagy valószínűséggel azért nem a Lipid-A egyik foszfátcsoportjához kapcsolódik, hanem a core egyik heptózához, mert csak az intakt R-LPS összetételű ioncsúcsoknál volt detektálható. Az egyes [M-H]⁻ kvázi-molekulaioncsúcsok mellett jelentkező kísérő csúcsok megfelelnek az [M+Na-2H]⁻ és [M+K-2H]⁻ addukt ionoknak, ezek a tisztított LPS mintában igen erőteljesen jelentkeznek. Az egyes tömegszámokhoz tartozó LPS komponensek kémiai összetételét a 4. táblázat foglalja össze.



15. ábra A *S. sonnei* endotoxin tri-acilált Lipid A komponense

4. táblázat A *Shigella sonnei* 41 LPS tömegspektrumain megjelenő $[M-H]^-$ kvázimolekulaionok m/z értékei, a hozzá tartozó elméleti (számított) m/z értékek, és az egyes tömegszámokhoz rendelt LPS komponensek kémiai összetétele.

<u>Lipid-A</u> <u>acilációs fok</u>	<u>Elemi összetétel*</u>	<u>Számított</u> <u>m/z</u>	<u>Kísérleti m/z</u>			
			Tisztított LPS	Bouillon- sejtsuszpenzió	Hőkezelt telep- sejtsuszpenzió	Telep- sejtsuszpenzió
<i>Lipid-A</i>						
Tetra-acil	3xC14(3-OH), 1xC12, 2xP	1360.7	1360.4	1360.4	1359.2	1362.0
Penta-acil	3xC14(3-OH), 1xC4(telítetlen), 1xC12, 2xP	1569.0	1568.8	1569.8	1570.8	-
Penta-acil	4xC14(3-OH), 1xC12, 2xP	1587.0	-	-	-	1586.5
Hexa-acil	4xC14(3-OH), 1xC14, 1xC12, 2xP	1797.4	1798.4	1796.6	1797.0	1797.7
<i>Lipid-A + Kdo + Hep</i>						
Tri-acil	2xC14(3-OH), 1xC12, 2xKdo, 2xHep, 2xP	1959.0	1959.1	1959.0	-	-
Tetra-acil	3xC14(3-OH), 1xC12, 2xKdo, 2xHep, 2xP	2185.4	2185.4	2183.6	2185.8	-
Tetra-acil	3xC14(3-OH), 1xC12, 2xKdo, 2xHep, 2xP, 1xPEtN	2308.4	-	2307.1	-	-
Penta-acil	3xC14(3-OH), 1xC14, 1xC12, 2xKdo, 2xHep, 2xP	2395.7	2394.7	2395.3	2395.5	2396.5
Penta-acil	3xC14(3-OH), 1xC14, 1xC12, 2xKdo, 2xHep, 2xP, 1xPEtN	2518.7	-	2520.9	2518.5	-
Hexa-acil	4xC14(3-OH), 1xC14, 1xC12, 2xKdo, 2xHep, 2xP	2622.1	2622.7	2621.8	2621.8	2623.3
Hexa-acil	4xC14(3-OH), 1xC14, 1xC12, 2xKdo, 2xHep, 2xP, 1xPEtN	2745.1	-	2745.9	2746.3	2747.1

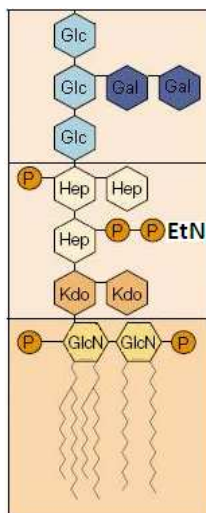
* minden Lipid-A-t tartalmazó komponens tartalmaz egy diglukózamin vázat is.
Rövidítések: P=foszfát csoport, PEtN=foszfoetanolamin, C14(3-OH)= β -hidroximirisztinsav, C14=mirisztinsav, C12=laurilsav, C14(telítetlen)=egyszeresen telítetlen mirisztinsav, Kdo=2-keto-3-deoxi-oktulonsav, Hep=heptóz.

5.4 *Shigella sonnei* 4303 sejtsuszpenzió MALDI-TOF MS analízise

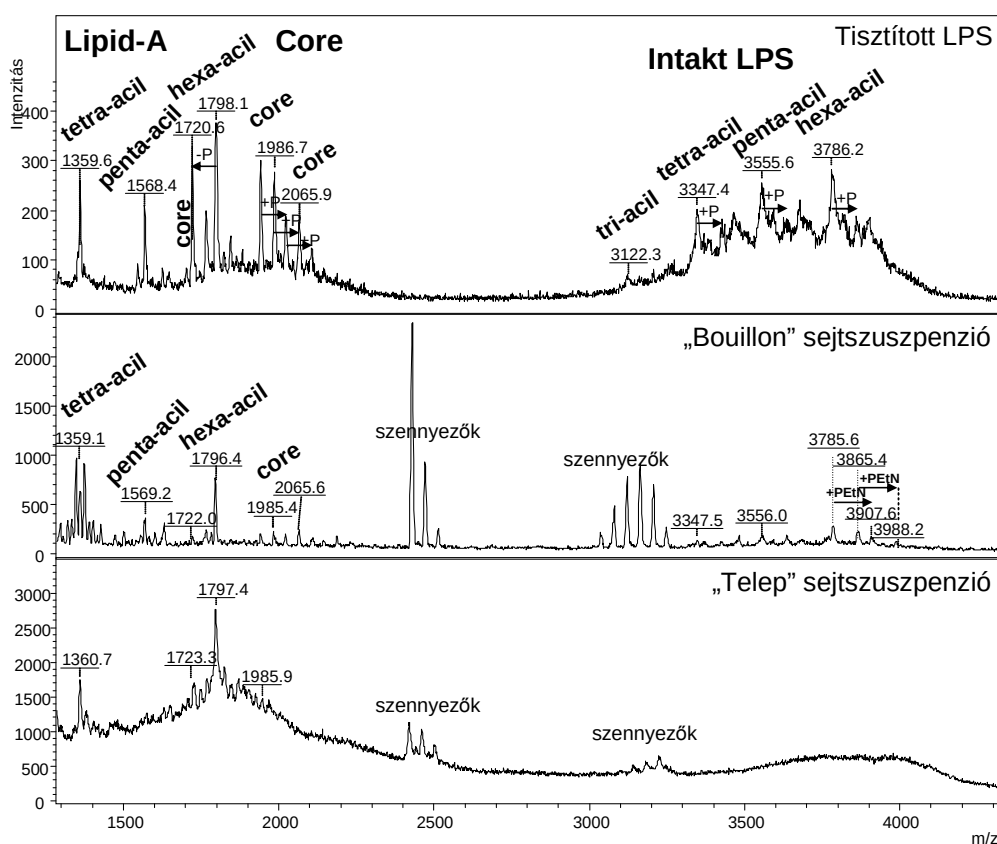
A *S. sonnei* 4303 (másnéven fázis II) baktériumtörzs a vad típusú *S. sonnei* fázis I virulencia plazmidot vesztett spontán mutánsa, melyből hiányzik az O-oldallánc szintéziséért felelős gén. A 4303 endotoxin tehát Lipid-A-ból és teljes szerkezetű core oligoszacharidból (belső + külső core egyaránt) áll, azonban nem kapcsolódik hozzá további O-poliszacharid lánc. Az általam vizsgált R-típusú endotoxinok közül tehát ez tartalmazta a legtöbb cukor molekulát (16. ábra).

A *S. sonnei* 4303 sejtsuszpenziók MALDI-TOF MS mérésekor érdekes módon a (nem hőkezelt) telep-sejtsuszpenzió mintáról igen, míg a hőkezelt telep-sejtsuszpenzióról nem

sikerült értékelhető tömegspektrumot felvennem, annak ellenére, hogy a méréseket két különböző mátrixszal és két különböző teleptenyézzel is megismételtem. Itt fontos megjegyezni, hogy a MALDI mérések során sajnos nem ismeretlen a gyenge reprodukálhatóság fogalma, különösen komplex minták esetében. Erről bővebben az 5.5 fejezetben szólok. A *S. sonnei* 4303 R-LPS tömegspektrumai a 17. ábrán láthatók.



16. ábra A *Shigella sonnei* 4303 endotoxin teljes szerkezete



17. ábra *Shigella sonnei* 4303 tisztított és sejtuszpenziókból felvett R-LPS negatív ion, lineár mód MALDI- TOF tömegspektrumai

A 4303 R-LPS tisztított és bouillon-sejtsuszpenzió mintáiról felvett tömegspektrumokon, viszonylag jó felbontással megjelentek külön a lipid és külön a core-oligoszacharid ioncsúcsai átfedő tömegtartományokkal, valamint az intakt R-LPS csúcsai. A telep-sejtsuszpenzióból csak a tetra- és a hexa-acilált Lipid-A, illetve néhány core részre jellemző ioncsúcsot tudtam egyértelműen beazonosítani, azonban az intakt R-LPS-re vonatkozó tömegszámokat nem sikerült detektálni. Ez valószínűleg azért van, mert minél több cukormolekulát tartalmaz az LPS annál nehezebben ionizálható a molekula. Láthatjuk továbbá, hogy a tisztított LPS mintában nem, viszont a bouillon-sejtsuszpenzióból származó mintában megjelentek a foszfoetanolaminra jellemző ioncsúcsok is $m/z=3907$ és 3988 körül. A két szuszpenzió mintában megjelentek nem LPS-re jellemző ion csúcsok is, de szerencsére ezek nem zavarták az analízist. Az egyes tömegszámokhoz tartozó javasolt kémiai összetételeket az 5. táblázatban foglaltam össze.

5. táblázat A *Shigella sonnei* R4303 LPS tömegspektrumain megjelenő $[M-H]^-$ kvázimolekulaionok m/z értékei, a hozzá tartozó elméleti (számított) m/z értékek, és az egyes tömegszámokhoz rendelt LPS komponensek kémiai összetétele.

<u>Lipid-A</u> <u>acilációs fok</u>	<u>Elemi összetétel*</u>	<u>Számított</u> <u>m/z</u>	<u>Kísérleti m/z</u>		
			Tisztított LPS	Bouillon- sejtsuszpenzió	Telep- sejtsuszpenzió
Lipid-A					
Tetra-acil	3xC14(3-OH), 1xC12, 2xP	1360.7	1359.6	1359.1	1360.7
Penta-acil	3xC14(3-OH), 1xC14, 1xC12, 2xP		1568.4	1569.2	-
Hexa-acil	4xC14(3-OH), 1xC14, 1xC12, 2xP	1797.4	1798.1	1796.4	1797.4
Core oligoszacharid fragmensek					
	1xKdo-CO ₂ , 3xHep, 5xHex, 2xP	1722.3	1720.6	1722.0	1723.3
	2xKdo, 3xHep, 5xHex, 2xP	1986.5	1986.7	1985.4	1985.9
	2xKdo, 3xHep, 5xHex, 3xP	2066.5	2065.9	2065.6	-
Lipid-A +Kdo+Core					
Tri-acil	2xC14(3-OH), 1xC12, 2xKdo, 3xHep, 5xHex, 4xP	3121.8	3122.3	-	-
Tetra-acil	3xC14(3-OH), 1xC12, 2xKdo, 3xHep, 5xHex, 4xP	3348.2	3347.4	3347.5	-
Penta-acil	3xC14(3-OH), 1xC14unsat, 1xC12, 2xKdo, 3xHep, 5xHex, 4xP	3556.5	3555.6	3556.0	-
Hexa-acil	4xC14(3-OH), 1xC14, 1xC12, 2xKdo, 3xHep, 5xHex, 4xP	3784.9	3786.2	3785.6	-

* minden Lipid-A-t tartalmazó komponens tartalmaz egy diglükózamin vázat is. Rövidítések: P=foszfát csoport, C14(3-OH)= β -hidroximirisztinsav, C14=mirisztinsav, C12=laurilsav, C14(telítetlen)=egyszeresen telítetlen mirisztinsav, Kdo=2-keto-3-deoxi-oktulonsav, Hep=heptóz, Hex=hexóz.

5.5 Mátrixok hatásának vizsgálata

A MALDI-TOF MS mérésekre általánosan érvényes, hogy a minta/mátrix kristályhalmazban akad egy vagy több pont, ahová célozva a lézersugárral intenzív tömegspektrometriás jelet kapunk, esetleg csakis onnan vagyunk képesek ionokat produkálni. Meglelni ezeket a pontokat nem triviális, ennek következtében jelentős mértékben megnő a mérésidő. Az ún. „hot spot”-okat, azaz a jó jelintenzitásokat adó minta/mátrix kristályhelyeket a mátrix eltérő mennyisége és/vagy különböző kristályosodása befolyásolja.

Az általam alkalmazott két mátrix anyag közül a DHB hosszabb ideig kristályosodott, viszont homogénebb kristályokat alkotott, míg a THAP gyorsan kristályosodott, viszont inhomogénebb kristályokat alkotott, ezért ennél nehéz volt a minta ionizálásához megfelelő kristály helyeket találni. Míg a DHB mátrixszal könnyű volt megtalálni a hot spot-okat addig a THAP-val készített minta/mátrix kristályhalmazból két egymást követő lézer-impulzus hatására (spot-to-spot) jelentősen eltértek az eredmények. Előfordult sajnos az is (a *S. sonnei* 4303 esetében), hogy a felcseppentett mintából egyik kristályhelyről sem tudtam ioncsúcsokat produkálni.

A MALDI-TOF készülék beépített kamerájának segítségével kinagyítva is láthatjuk az egyes mátrix/minta elegyek kristályosodása utáni képét (18. ábra).



(a)



(b)

18. ábra A THAP (a) és a DHB (b) mátrixok kristályosodása a MALDI mintatartón

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az endotoxinok (bakteriális lipopoliszacharidok) kémiai szerkezete nagymértékben befolyásolja a bioaktivitásukat. Az endotoxinok strukturális analízisének törekedni kell az intakt endotoxinok vizsgálatára a hidrolizátumok helyett, hogy reálisabb képet kapjunk a minták természetes heterogenitásáról, valódi szerkezetéről. Munkám során olyan egyszerű és gyors endotoxin kivonási és mintaelőkészítési módszereket dolgoztam ki, melyekkel az *E. coli*, *Salmonella minnesota* és *Shigella sonnei* R-típusú, intakt endotoxinok MALDI-TOF tömegspektrometriás szerkezet meghatározását sikerült elvégezni csupán néhány száz mikroliter sejtsuszpenzióból. Az irodalom szerint, korábban nem történtek olyan vizsgálatok, melyek közvetlenül sejtenyészetekből vizsgáltak volna bakteriális endotoxinokat tömegspektrometriával.

Kísérleti eredményeimben az 1 napos mintaelőkészítési eljárással kapott bouillon-sejtsuszpenziók esetében, az általam vizsgált összes enterobakteriális endotoxinról teljes értékű tömegspektrumot sikerült kapnom, míg a 30 perces mintaelőkészítéssel nyert hőkezelt telep-sejtsuszpenzió minták mérésével a karakterisztikus ioncsúcsok többségét detektálni tudtam. A kevés számú baktérium telepből 5 perces mintaelőkészítéssel kapott sejtsuszpenzió vizsgálata során nehézkes volt a több cukor molekulát tartalmazó endotoxinok kellő érzékenységgel való MS detektálása. Egy fontos tényező, ami befolyásolta a tömegspektrumok alakulását a megfelelő kristályhelyek, az ún. hot spot-ok megtalálása volt.

Valamennyi endotoxin vizsgálatánál komplex tömegspektrumokat kaptam, melyek egyrészt előzetes adatbázis hiányában megnehezítik a kiértékelést, másrészt információtartalommal bírnak az lipopoliszacharidok aciláltsági fokát és foszforilációját illetően. Az egyes ioncsúcsokhoz tartozó elemi összetétel meghatározás során megállapítottam, hogy a *Shigella sonnei* 41 és 4303 törzsek sejtsuszpenzióiban lévő endotoxin olyan komponenseket is tartalmaz, ami az ugyanezen törzsekből nyert, tisztított endotoxinban nem voltak detektálhatók.

Az általam kidolgozott módszerekről tehát elmondható, hogy rövidebb ideig tart, kíméletesebb, és kevesebb minta mennyiséget és vegyszerfelhasználást igényel, mint a hosszadalmas endotoxin kivonási módszerek, ezen felül pedig olyan fontos, de labilis kötésű funkciók csoportok jelenlétének detektálására is alkalmas, mint pl. esetünkben a foszfoetanolamin, amik a tisztított LPS mintákból valószínűleg a tisztítási eljárások során elveszhetnek. Az említett előnyök miatt ezek a módszerek alkalmasak lehetnek nagyszámú

baktériumok mutánsokból származó sejtszuszpenziók, és azok endotoxin tartalmának összehasonlító vizsgálatára, vagy akár klinikai minták gyors analízisére.

Az egyes sejtszuszpenzió mintákból MALDI-TOF tömegspektrometriával meghatározott endotoxinok legnagyobb molekuláris komponenseinek elemi összetételét a 6. táblázatban foglaltam össze.

6. táblázat Összefoglaló táblázat az R-típusú sejtszuszpenziókból detektált LPS-ek MALDI-TOF tömegspektrometriával kapott eredményeiről. Az elemi összetétel az egyes R-LPS-ek legnagyobb molekuláris komponensének összetételét jelenti.

LPS	Kísérleti molekulatömeg	Elemi összetétel
<i>E. coli</i> D31	2238.7	hexa acilált Lipid-A+2 KDO+2P
<i>Salmonella minnesota</i> R595	2609.5	hepta acilált Lipid-A+2 KDO+1Ara4N+ 2 P
<i>Shigella sonnei</i> 4350	2238.2	hexa acilált Lipid-A+ 2 KDO+2 P
<i>Shigella sonnei</i> R41	2747.3	hexa acilált Lipid-A+2 KDO+2Hep+2P+1 PEtN
<i>Shigella sonnei</i> 4303	3989.2	hexa acilált Lipid-A+2 KDO+ 3 Hep+5 Hex+4 P +1 PEtN

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megragadni az alkalmat arra, hogy köszönetemet és tiszteletemet fejezzem ki témavezetőmnek, Dr. Kilár Anikó tudományos munkatársnak rendkívüli szakértelméért és segítőkészségéért, türelméért, a rengeteg segítségért és, hogy mindvégig figyelemmel kísérte pályamunkám elkészültét. Továbbá köszönet Kocsis Béla docensnek és Kocsisné Erikának, az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet munkatársának a baktérium tenyészetekért.

Köszönöm Sándor Viktornak a Bioanalitikai Intézet munkatársának, a laboratóriumi munkában való segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak az önzetlen támogatást, és barátaimnak a segítséget a nehézségek megoldásában.

8. IRODALOMJEGYZÉK

Berczi I. (2002): Stressz és immunitás. *Focus Medicinæ* **4**:5-17.

Bertók L. (2004): Az endotoxin szerepe a természetes immunitásban. *Magyar Tudomány*. **10**:1130

Beutler B. (2011): How mammals sense infection: from endotoxin to the Toll-like receptors. Nobel díjas előadás. www.nobelprize.org

Brandenburg, K., Wagner, F., Müller, M., Heine, H., Andrä, J., Koch, M.H.J., Zähringer, U., Seydel, U. (2003). Physicochemical characterization and biological activity of a glycoglycerolipid from *Mycoplasma fermentans*. *European Journal of Biochemistry* **270**:3271-3279.

Caroff M., Karibian D. (2003) Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research* **338**:2431-2447

Caroff M, Tacken A, Szabo L. (1988). Detergent-accelerated hydrolysis of bacterial endotoxins and determination of the anomeric configuration of the glycosyl phosphate present in the "Isolated lipid A" fragment of the *Bordetella pertussis* endotoxin. *Carbohydrate Research* **175**:273–282.

Galanos C, Lüderitz O, Westphal O. (1969). A new method for extraction of R-lipopolysaccharides. *European Journal of Biochemistry* **9**:245–249.

Gram, H.C. (1884). Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medicin* **2**:185-189.

Hitchcock PJ, Brown TM. (1983). Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Bacteriology* **154**:269–277.

Kawasaki K. (2009). Alternative procedures for analysis of lipid A modification with phosphoethanolamine or aminoarabinose. *Journal of Microbiological Methods* **76**:313–315.

Kilár A., Dörnyei Á., Kocsis B. (2013). Structural characterisation of bacterial lipopolysaccharides with mass spectrometry and on-and of-line separation techniques. *Mass Spectrometry Reviews* **32**:90-117

Kilár A., Dörnyei Á., Bui A., Szabó Z., Kocsis B., Kilár F. (2011). Structural variability of endotoxins from R-type isogenic mutant of *Shigella sonnei*. *Journal of Mass Spectrometry* **46**:61-70

Kontrohr T, Kocsis B. (1981). Isolation of adenosine 5'-diphosphate-D-glycero-D-mannoheptose. An intermediate in lipopolysaccharide biosynthesis of *Shigella sonnei*. *Journal of Biological Chemistry* **256**:7715–7718.

Kocsis, B., Kontrohr, T. (1984). Isolation of adenosine 5'-diphosphate-L-glycero-D-mannoheptose, the assumed substrate of heptose transferase(s), from *Salmonella minnesota* R595 and *Shigella-sonnei* Re mutants. *Journal of Biological Chemistry* **259**: 11858-11860.

Kutuzova G.D., Albrecht M. R., Erickson M.C., Qureshi N. (2001). Diphosphoryl Lipid A from *Rhodobacter sphaeroides* Blocks the Binding and Internalization of Lipopolysaccharide in RAW 264.7 Cells. *The Journal of Immunology* **167**: 482-489.

Moskowitz SM, Ernst RK, Miller SI. (2004). PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *Journal of Bacteriology* **186**:575–579.

Nowotny A., Spitzer J.J., Ziegler E.J. (1990): Cellular and Molecular Aspects of Endotoxin Reactions: Endotoxin Research Series Vol. I. Nowotny (szerk).-Molecular structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity- Elsevier Sci. Publ.

Péter Sz. (2013). Sejtlizátumból származó endotoxinok vizsgálata mikrochip elektroforézissel és MALDI-TOF tömegspektrometriával. Szakdolgozat.

Péterfi Z. (2007). *Proteus morganii* törzsek szerológiai keresztkapcsolatai. PhD értekezés.

Qureshi N., Takayama K, Mascagni P., Honovich J., Wong R., Cotter J. R. (1988). Complete Structural Determination of Lipopolysaccharide Obtained from Deep Rough Mutant of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **263**: 11971-11976.

Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Ulmer A.J., Holst O., Brade H., Schmidt G., Mamat U., Grimmecke H.D., Kusumoto S. (1993): The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology*. **187**(3-5):169-90.

Silipo A, De Castro C, Lanzetta R, Molinaro A, Parrilli M, Vago G, Sturiale L, Messina A, Garozzo D. (2008). Structural characterizations of lipids A by MS/MS of doubly charged ions on a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* **43**:478–484.

Sturiale L, Garozzo D, Silipo A, Lanzetta R, Parrilli M, Molinaro A. (2005). New conditions for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of native bacterial R-type lipopolysaccharides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19**:1829–1834.

Therisod H., Labas V., Carof M. (2001). Direct microextraction and analysis of rough-type lipopolysaccharides by combined thin-layer chromatography and MALDI mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **73**:3804-3807

Westphal O., Lüderitz O., Bister F. (1952): Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Zeitschrift für Naturforschung* **7**:148-155

Zhou P, Altman E, Perry MB, Li J. (2010): Study of matrix additives for sensitive analysis of lipid A by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* **76**:3437–3443.