

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA



ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2023

ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV

eŠVK
PRIF UK
2023

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA**



**ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ
KONFERENCIA PriF UK 2023**

Zborník recenzovaných príspevkov

**26. apríl 2023
Bratislava, Slovenská republika
Univerzita Komenského v Bratislave
ISBN 978-80-223-5608-4 (tlač)
ISBN 978-80-223-5609-1 (online)**

Glykány apolipoproteínu C-III ako alternatívny diagnostický biomarker pri diagnostike kolorektálneho karcinómu

Kristína Kianičková¹, Zuzana Pakanová², Filip Květoň², Alena Holazová¹, Peter Baráth², Goran Miljuš³, Olgica Nedić³, Jaroslav Katrlík¹

¹*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Oddelenie glykobiotechnológie, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika; chemkian@savba.sk*

²*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Oddelenie glykobiológie, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika*

³*Belehradská univerzita, Inštitút pre aplikáciu jadrovej energie (INEP), Banatska 31b, 11080 Belhrad-Zemun, Srbsko*

Abstract

Glycans of apolipoprotein C-III as alternative diagnostic biomarker in diagnostic of colorectal cancer

The association of many apolipoproteins with CRC was reported, however there are missing studies about the role of serum apolipoprotein C-III in colorectal cancer (CRC) up to this date. The aim of the study was to determine the O-glycoprofile of serum apolipoprotein C-III of CRC patients, that consists of three glycosylated and one aglycosylated structure, and comparing data with healthy individuals. The main goal of this study was focused on correlations between the ratio of its glycoforms and CRC. The results from MALDI-TOF MS analysis showed elevated apolipoprotein C-III sialylation, represented by statistically significant increase in levels of disialylated core 1 type O-glycan in CRC samples. This change in glycan composition could be considered as a potential CRC biomarker, despite it is non-specific, as it can be also an accompanying sign of the other ongoing inflammation. The analysis of apolipoprotein C-III glycoforms by mass spectrometry might be included in the panel of non-invasive diagnostic biomarkers when considering CRC in suspected patients.

Keywords: glycosylation; apolipoprotein C-III; colorectal cancer; mass spectrometry

Úvod a formulácia cieľa

Apolipoproteíny tvoria viazaním sa s lipidmi lipoproteíny, sú teda štruktúrnymi prvkami lipoproteínov a tiež kofaktormi enzýmov. Sú považované za promotérov proliferácie a invazívnosti pri karcinogenéze a participujú tiež na antitumorovej imunite, oxidatívnom strese alebo doručovaní liečiv [1]. Skupina apolipoproteínov pozostáva z 22 členov a väčšina z nich zohráva úlohu pri rakovine [2].

Z publikovaných štúdií vyplýva, že zmenené hladiny apoA-I, apoC-I, apoD, apoE, apoL-VI, apoM a apoJ súvisia s kolorektálnym karcinómom (CRC) [2, 3]. Ako jeden z konkrétnych príkladov možno uviesť potenciál prognostického významu pomeru apoB-I/apoAI pri diagnostike CRC, kde vyššia hodnota tohto pomeru súvisela s kratšou dobou prežitia [1]. Expresia apoC-III je takmer dvakrát nižšia pri pacientoch s rakovinou žalúdka v porovnaní so zdravými kontrolami [4]. Doteraz nebola skúmaná expresia apolipoproteínu C-III (apoC-III) v súvislosti s pacientami s CRC.

ApoC-III pozostáva zo 79 aminokyselín a obsahuje jeden core 1 O-glykán na Thr-74

[5]. Z hľadiska sialylácie možno rozlíšiť tri hlavné glykoformy: nesialovanú apoC-III₀, monosialovanú apoC-III₁ a disialovanú apoC-III₂ formu; existujú však aj nesialované glykovarianty ako napríklad aglykozylovaný apoC-III₀₀ [6]. Túto izoformu možno stanoviť metódami hmotnostnej spektrometrie, pomocou tradičnej metódy izoelektrického fokusovania ju však nemožno stanoviť.

Aplikácia laserovej desorpcie a ionizácie podporenej maticou (MALDI) a elektrosprejovej ionizácie (ESI) v hmotnostnej spektrometrii (MS) pre stanovenie apoC-III bola popísaná a aplikovaná Bondarenkom a kol. [7]. Analýza intaktného apoC-III nesúceho O-glykány ho predurčuje ako vhodného kandidáta pre priamu analýzu pomocou MS na základe jeho pomerne nízkej molekulovej hmotnosti bez potreby tradičných chemických a enzymatických úprav využívaných v proteomike. Cieľom práce bolo stanoviť glykoprofíl apoC-III v patientskych vzorkách s diagnózou CRC a porovnať získané dáta so skupinou zdravých jedincov za účelom štatistického porovnania dát a sledovania prípadných korelácií v pomeroch zistených glykoforiem apoC-III medzi týmito skupinami.

Materiál a metódy

Vzorky séra v prípade CRC boli zbierané od pacientov, ktorí boli sledovaní v Klinickom centre „Bežanijska kosa“ (n = 42, vek 34-73 rokov). Pacientom bol diagnostikovaný CRC použitím kolonoskopie, transrektálneho ultrazvuku a abdominálneho CT; určený bol taktiež stupeň diferenciácie karcinómu. Kontrolná skupina vzoriek pozostávala zo sér zdravých jedincov (n = 40, vek 35-74 rokov). Vzorky boli vo všetkých prípadoch odoberané ráno po 12 hodinách pôstu pred odberom.

Analýza pomocou hmotnostnej spektrometrie bola vykonaná metódou MALDI TOF MS, použitým typom detektora bol hmotnostný analyzátor doby letu (TOF). Pre MS analýzu bolo vstupným množstvom 10 µL séra, ktoré bolo inkubované s 250 µL 200 mM peroxidu vodíka pri 30 °C počas 30 minút s prídavkom 0,1 % kyseliny trifluóroctovej (TFA), aby bola dosiahnutá úplná oxidácia metionínov v proteínovej sekvencii a zjednotené signály v MS spektrách. K obohateniu apoC-III bola použitá extrakcia tuhou fázou: Strata C8, 96-jamková platňa, 25 mg náplne/jamka. Platňa bola premytá acetonitrilom (ACN) a ekvilibrovaná 0,1 % TFA. Po nadávkovaní vzorky boli jamky postupne premyté 0,1 % TFA a 30 % ACN + 0,1 % TFA (TA30). Obohatená frakcia apoC-III bola eluovaná 70 % ACN + 0,1 % TFA (TA70). 1 µL eluátu bol naspotovaný na *AnchorChip* MALDI platňu s prídavkom 1 µL 2 % TFA pre zlepšenie ionizácie a 1 µL matrice pozostávajúcej zo zmesi 20 mg/mL 2,5-dihydroxyacetofenónu v ACN a 18 mg/mL hydrogécitránu diamónneho v etanole

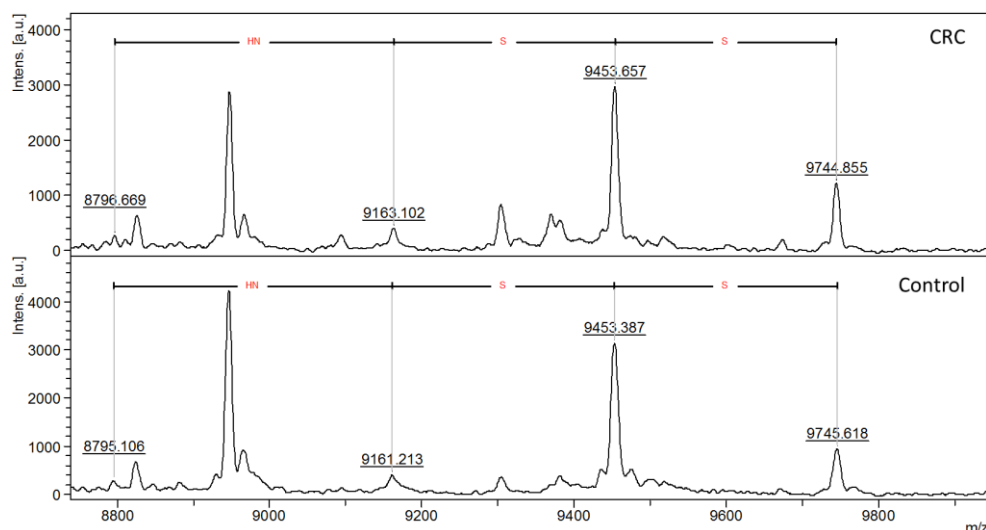
(DHAP:DAC, pomer 3:1). Každá vzorka bola spotovaná v duplikáte. Spektra boli získané v lineárnom TOF móde pozitívnych iónov pomocou prístroja *UltrafleXtreme II MALDI mass spectrometer* (*Bruker Daltonics, Nemecko*). Získané MS dáta boli spracované manuálne, pomocou softwaru *flexAnalysis 3.4* (*Bruker Daltonics, Nemecko*) a porovnané s dostupnou literatúrou [8, 9].

Intenzity aglykozylovanej (m/z 8797), nesialovanej (m/z 9162), monosialovanej (m/z 9453) a disialovanej glykoformy apoC-III (m/z 9744) boli extrahované zo získaných dát pomocou softvérového programu *flexAnalysis*. Jednotlivé glykoformy boli kvantifikované pomocou pomerov relatívnej intenzity pík. Pomocou softvérového programu *Microsoft Excel* boli vypočítané priemerné hodnoty, t-testy a štandardné odchýlky. Štatistická významnosť spracovaných dát bola stanovená pomocou troch hladín významnosti t-testu: $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$ a $p \leq 0,005$.

Štúdia bola schválená Etickou komisiou Klinického centra „Bežanijska kosa“ (Schválenie č. 3562) podľa Helsinskej deklarácie. Všetci participanti udelili pre štúdiu informovaný súhlas.

Výsledky a diskusia

Výsledky MS analýzy poukazujú na znížené množstvo aglykozylovanej, nesialovanej a monosialovanej apoC-III glykoformy a významné zvýšenie disialovanej apoC-III glykoformy v prípade CRC vzoriek v porovnaní s kontrolami.



Obr. 1. Reprezentatívne MS spektrá vybranej CRC a kontrolnej vzorky zobrazujúce všeobecnú distribúciu apoC-III glykoform: aglykozylovaná (m/z 8796), nesialylovaná (m/z 9163), monosialylovaná (m/z 9453) a disialylovaná (m/z 9745). H – hexóza, N – N-acetylglukóзамín, S – kyselina sialová. Dáta získané v lineárnom móde s rozlíšením <2500 .

Reprezentatívne MS spektrá séra CRC pacienta a kontrolnej vzorky možno vidieť na Obr. 1. Štatistická významnosť medzi CRC a kontrolnými vzorkami bola vypočítaná pre 3 zo 4 glykoforiem apoC-III, menovite šlo o aglykozylovanú ($p = 0,006$), monosialovanú ($p = 0,020$) a disialovanú ($p = 0,002$) apoC-III formu, Tab. 1. Zmenená sialylácia v prípade CRC vzoriek je štatisticky najvýznamnejšia v prípade plne sialovanej (disialylovanej) O-glykánovej štruktúry, pričom daná štruktúra mala vyššie zastúpenie v CRC vzorkách. Doplnkom tejto informácie je zníženie všetkých apoC-III prekursorov danej štruktúry: aglykozylovanej, nesialovanej a monosialovanej glykoformy apoC-III.

Tab. 1. Relatívna odozva pre štyri glykoformy apoC-III v skupine kontrolných a CRC vzoriek spolu s hodnotou smerodajnej odchýlky, pomer relatívnej odozvy CRC a kontrolných vzoriek a štatistická evaluácia rozdielu vyjadrená pomocou p hodnoty.

Glykoforma apoC-III	Relatívna odozva, kontroly (n = 40) (v %, $\pm$ SD)	Relatívna odozva, CRC vzorky (n = 42) (v %, $\pm$ SD)	Pomer relatívnej odozvy CRC / kontrol	p hodnota ***$p \leq 0,005$ **$p \leq 0,01$ *$p \leq 0,05$
Aglykozylovaná (apoC-III ₀₀)	7,87 $\pm$ 2,80	6,16 $\pm$ 2,73	0,78	0,006**
Nesialylovaná (apoC-III ₀)	9,48 $\pm$ 1,72	9,18 $\pm$ 1,71	0,97	0,436
Monosialylovaná (apoC-III ₁)	61,99 $\pm$ 6,58	58,55 $\pm$ 6,50	0,94	0,020*
Disialylovaná (apoC-III ₂)	20,66 $\pm$ 7,30	26,10 $\pm$ 8,08	1,26	0,002***

Záver

Hoci príčiny a mechanizmus vzniku pozorovanej hypersialylácie apoC-III pri CRC nie sú jasné a môžu byť sekundárnou príčinou, napríklad ako sprievodný znak prebiehajúceho zápalu v tele, analýza glykoforiem apoC-III môže byť užitočným nástrojom v paneli neinvazívnych diagnostických testov pri posudzovaní CRC pri suspektných pacientoch. Stanovenie sialylácie jednotlivých glykoforiem apoC-III tiež nesie značný potenciál pre ďalšie klinické aplikácie, napríklad monitorovanie ochorenia. Vďaka svojej robustnosti, rýchlosti merania a citlivosti je MALDI TOF MS metódou vhodnou pre tento účel. Využitie analýzy glykoforiem apoC-III v 96-jamkovom formáte predurčuje túto metódu ako vhodnú pre vysokovýkonnú diagnostiku, čo je v dnešnej dobe jedným z hlavných cieľov v diagnostike rakovinových ochorení.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vĎaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: CEMBAM - Centrum medicínskeho bioaditívneho výskumu a výroby, ITMS: 313011V358, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Yang D. D., Chen Z. H., Wang D. S., et al. (2020) J. Canc. 11(5), p. 1063
- [2] Ren L., Yi J., Li W. et al. (2019) Canc. Med. 8(16) p. 7032
- [3] Zhang Y., Zheng L. (2020) Transl. Cancer Res. 9(5), p. 3712
- [4] Wang M., Wang J., Jiang H. (2019) Oncol. Lett. 17(3), p.3227
- [5] Wada Y., Kadoya M., Okamoto N. (2012) Glycobiology, 22(8), p. 1140
- [6] Demus D., Naber A., Dotz V. et al. (2021) Front. Chem. 9, p. 678883
- [7] Bondarenko P. V., Cockrill S. L., Watkins L. K., et al. (1999) J. Lipid Res. 40(3), p. 543
- [8] Wada Y. (2016) Glycoconj. J. 33(3), p. 297
- [9] UniProt Consortium. (2021) Nucleic Acids Res. 49(D1), p. D480