

'Poli- β -(1 \rightarrow 6)-N-acetil glükózamin spacerrel ellátott oligoszacharid sorozatának és ezek fehérje konjugátumainak szintézise' című, 73064 sz. OTKA pályázat részletes záró szakmai beszámolója

Az elért eredmények ismertetése:

Az elmúlt néhány évtizedben a *Staphylococcusok* váltak a legmeghatározóbb mikroorganizmusokká, melyek felelősek a különböző implantátumok és orvosi eszközök alkalmazása során kialakuló fertőzésekért. Az antibiotikumokkal szemben kialakult rezisztenciájuk miatt a megelőzés lehet alternatív gyógymód a kórokozók ellen. *Staphylococcus aureus* és *S. epidermidis* fertőzések esetében egyik virulens faktor a poli- β -(1 \rightarrow 6)-N-acetil glükózamin (PNAG) sejt felszíni polisacharid antigén. Állatkísérletekkel bizonyítást nyert, hogy tisztított PNAG védő immunitást nyújt mind *S. aureus* és mind pedig *S. epidermidis* ellen és ezért potenciális vakcina jelöltnek javasolják a *Staphylococcus* fertőzésekkel szemben. Kutatásunk célja PNAG oligoszacharid sorozatának szintézise megfelelő spacerrel, majd a szintetikus oligoszacharidok fehérje konjugátumainak előállítását volt immunológiai sajátásaik vizsgálatának céljából.

Elsőként szintetikus stratégiát dolgoztunk ki a PNAG oligoszacharid fragmenseinek felépítéséhez szükséges védett glükózamin monomerek előállítására. A szintézis kiindulási anyagának az irodalomból már ismert fenil-3,4,6-tri-*O*-acetil-2-dezoxi-2-ftálimido-1-tio- β -D-glükopiranozidot választottuk. Ezt a vegyületet Zemplén szerint elszappanosítottuk, majd a primer hidroxil csoportot tritileztük, a többi hidroxil csoportot pedig acetileztük, végül a tritil csoport savas hidrolízisével nyertük a diszacharid egység szintéziséhez szükséges glikozil akceptort.

Ezután megvalósítottuk a magasabb tagszámú oligoszacharidok szintézisét. A fenti vegyület szabad 6-OH csoportját klóracetileztük, majd a kapott származékot bróm cukorra alakítottuk és elvégeztük vele az előbbieken leírt akceptornak a glikozilezését AgOTf promotor jelenlétében. Az ily módon kapott diszacharidot glikozil akceptorra alakítottuk a 6-klóracetil csoport szelektív eltávolításával. A teljesen védett diszacharidot bróm cukorra alakítottuk, majd végrehajtottuk vele a fent említett diszacharid akceptornak a glikozilezését és nyertük a tetraszacharid egységet. A feniltio aglikonnal rendelkező tetraszacharidot glikozil akceptorra alakítottuk a terminális primer hidroxil csoport szelektív felszabadításával.

Ezt követően előállítottuk a PNAG két nagyobb tagszámú fragmensét egy hexa- és egy oktaszacharidot. Az előbbi 2+4-es, míg az utóbbit 4+4-es blokk szintézissel valósítottuk meg. Ezekben a kapcsolási reakcióban a korábbiakban már előállított tiofenil aglikonnal rendelkező tetraszacharid akceptort glikozileztük az első esetben a tetraszacharid szintézisére már alkalmazott diszacharid bróm cukorral, míg a második esetben a feniltio tetraszacharidból elemi brómmal nyert donorral és így kaptuk a megfelelő hexa-, illetve oktaszacharid egységeket.

Dr. Kandra Lili és Dr. Gyémánt Gyöngyi laboratóriumában a DE Szeretlen és Analitikai Kémiai tanszéken egy amerikai kutatócsoporttal együttműködve a Dispersin B (DspB) nevű enzim vizsgálatával foglalkoznak. Ezt az enzimet a fent említett amerikai kutatócsoport, N. Ramasubbu és munkatársai izolálták *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Gram-negatív baktériumból, amely szintén biofilm segítségével tapad meg a különböző felületeken. Vizsgálataik során bizonyították, hogy a DspB enzim választja le a felületről és segíti elő a baktérium szétterjedését a környezetben a baktérium által termelt biofilm hasításával. Későbbi vizsgálatok során megállapították azt is, hogy ez az enzim képes a *S. epidermidis* baktériumok által termelt biofilm hasítására is, mivel mindkét baktérium biofilmjének fő szénhidrát komponense PNGA. Ennek megfelelően a staphylococcus fertőzések elleni küzdelem egy másik eszköze lehet a DspB enzim alkalmazása antibiofilm ágensként. Az enzim további tulajdonságainak felderítéséhez szükség volt egy olyan

szubsztrát sorozatra, amelynek tagjai UV aktív aglikonnal rendelkeznek, *N*-acetyl-glükózamin egységekből épülnek fel és β -(1 \rightarrow 6) interglikozidos kötések tartalmazzák. Az általunk előállított feniltio glikozidok a fenti feltételeknek megfelelnek, ezért Dr. Kandra Lili és Dr. Gyémánt Gyöngyi kérésére kutatási céljainkat kiegészítettük a DspB enzim vizsgálatára alkalmas szubsztrátok szintézisével.

Ennek megfelelően a fent leírt szintézis utat felhasználva a korábban előállított feniltio aglikonnal rendelkező di- és tetraszacharid mellé megvalósítottuk még egy trimernek és pentamernek a szintézisét is védett formában. A tri- és pentaszacharidok előállításakor az irodalomból már ismert 1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-dezoxi-2-ftálimido- α -D-glükopiranozil-bromiddal végeztük el a korábban már leírt di- és tetraszacharid akceptorok glikozilezését. Az előállított fenil tioglikozidokról eltávolítottuk a védőcsoportokat, előbb az észter csoportokat hidrolizáltuk el etiléndiaminnal, majd a szabad amino és hidroxil csoportokat acetileztük. Azért nem acetileztük szelektíven az amino csoportokat, mert a ftálimido csoportok eltávolítása egy meglehetősen komplex reakcióelegyet eredményezett és azt tapasztaltuk, hogy a peracetilezett *N*-acetyl származékokat könnyebb izolálni oszlopkromatográfiával, mint a szabad *N*-acetyl származékokat. Végül az ily módon kapott oligoszacharidok Zemlén szerinti elszappanosítással kaptuk a szabad szubsztrát sorozatot, melynek hidrolízisét a fenti kutatócsoport hajtotta végre DspB enzimmal és ennek mutánsaival. A szubsztrátok, azaz feniltio aglikonnal rendelkező, β -(1 \rightarrow 6)-*N*-acetyl-glükózamin oligoszacharidok (diszacharidtól-pentaszacharidig) szintéziséről és enzimológiai vizsgálatáról egy közlemény jelent meg. [*Carbohydr. Res.*, **346**, 1445-1453, (2011)].

Az előállított tiofenil aglikonnal rendelkező oligoszacharid sorozat fehérjéhez történő konjugálását formil-heptil hídmolekulán keresztül kívántuk megvalósítani, ennek megfelelően előállítottuk az irodalomból ismert 7-(1,3-dioxán-2-il)-heptán-1-olt, amelyben a formil csoport acetálos védőcsoporttal van maszkírozva.

Ezután az oligoszacharidok fehérjéhez történő konjugálásának reakciókörülményeit vizsgáltuk. Először előállítottunk egy 7-(1,3-dioxán-2-il)-hept-1-il aglikonnal rendelkező szabad maltóz származékot, melyről savas hidrolízissel eltávolítottuk a spacer acetálos védőcsoportját, majd az így kapott aldehidet reagáltattuk bovine serum albuminnal (BSA) puffer oldatban és a képződő Schiff-bázist NaCNBH₃-del redukáltuk. A szénhidrát-fehérje molarány változtatásával a BSA-hoz kapcsolódott maltóz egységek számát tudtuk növelni, és így négy különböző glikoproteint sikerült előállítani. A glikokonjugátumokat kapilláris gélelektroforézissel vizsgáltuk, valamint a BSA-hoz konjugálódott diszacharid egységek számát MALDI-TOF tömegspektrometriával határoztuk meg. Ezenkívül tanulmányoztuk a kapott glikokonjugátumok immunológiai tulajdonságait. Egerek immunizálásával előállított poliklonális antitesteket ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) immunanalitikai módszerrel vizsgáltuk és sikerült bizonyítani glikoproteinekre specifikus antitestek jelenlétét. [*Electrophoresis*, közlésre elfogadva]

Ezt követően 7-(1,3-dioxán-2-il)-heptán-1-ollal meghosszabbítottuk a megfelelően védett mono-, di-, tetra- hexa- és oktaszacharid egységeket NIS/TfOH promotor rendszer jelenlétében elvégzett glikozilezési reakcióban. Az ily módon előállított vegyületekről eltávolítottuk a védőcsoportokat a feniltio aglikonnal rendelkező oligoszacharidok esetében már leírt védőcsoport eltávolítást alkalmazva és kaptuk a szabad haptén vegyületeket. Sajnos az oktaszacharid esetében a ftálimido csoportok eltávolítása többszöri próbálkozás után sem volt eredményes.

Ezután újabb kísérleteket hajtottunk végre, az előállított szabad *N*-acetyl-glükózamin oligoszacharid BSA-hoz történő konjugálásának megvalósításához. Savas hidrolízis után a formil-heptil aglikonnal rendelkező monoszacharid haptén esetében a redukív aminálást két különböző pH-jú pufferben végeztük el, 7-es pH-jú foszfát pufferben és 10-es pH-jú karbonát-bikarbonát pufferben. Vizsgáltuk még a haptén mennyiségének a növelését is adott fehérje

menyiség mellett. Mind a négy konjugálás sikeres volt és azt tapasztaltuk, hogy a 7-es pH-jú puffer oldat, illetve a nagyobb haptén felesleg alkalmazása kedvezőbb, mert ezek között a reakciókörülmények között nőtt a BSA-ra felvitt haptén egységek száma.

A di- tetra- és hexaszacharid haptén esetében elvégzett konjugálások is sikeresek voltak, de ezt már csak a kedvezőbb 7-es pH-jú foszfát pufferben valósítottuk meg. Elvégeztük a di- és tetraszacharidok konjugálását nagyobb haptén felesleg alkalmazása esetében is és sikeresen tudtuk növelni a BSA-ra felvitt haptén egységek számát, amely lehetővé teszi a fehérjére felvitt szénhidrátok sűrűsége és a biológiai aktivitás közötti összefüggés tanulmányozását.

A tiofenil aglikonnal rendelkező hexa- és oktaszacharidok szintéziséről, az előállított tiofenil oligoszacharidok védett formil-heptil spacerrel történő meghosszabbításáról, a védőcsoportok eltávolításáról, valamint a kapott haptén molekulák BSA-hoz történő konjugálásáról egy közlemény készült el. [Glycoconjugate J., *közlésre benyújtva*] Az előállított glikokonjugátumok immunológiai vizsgálata folyamatban van.

A kutatási időszakban előállított vegyületek szerkezetét NMR spektroszkópiával és MALDI-TOF tömegspektroszkópiával igazoltuk.

A kutatási időszak során megjelent összes közlemény:

1. Z.B. Szabó, M. Herczeg, **A. Fekete**, Gy. Batta, A. Borbás, A. Lipták, S. Antus
Synthesis of three regioisomers of the pentasaccharide part of the Skp1 glycoprotein of *Dictyostelium discoideum*.
Tetrahedron: Asymmetry, **20**, 808-820, (2009). IF: 2.625
2. **A. Fekete**, A. Borbás, S. Antus, A. Lipták
Synthesis of 3,6-branched arabinogalactan-type tetra- and hexasaccharides for characterization of monoclonal antibodies.
Carbohydr. Res., **344**, 1434-1441, (2009). IF: 2.025
3. Zs. Jakab, **A. Fekete**, A. Borbás, S. Antus, A. Lipták
Synthesis of new sulfonic acid-containing oligosaccharide mimetics of sialyl Lewis A.
Tetrahedron, **66**, 2404-2414, (2010). IF: 3.011
4. L. Lázár, M. Herczeg, **A. Fekete**, A. Borbás, A. Lipták, S. Antus
Synthesis of sulfonic acid analogues of the non-reducing end trisaccharide of the antithrombin binding domain of heparin
Tetrahedron Lett., **51**, 6711-6714, (2010). IF: 2.618
5. **A. Fekete**, A. Borbás, Gy. Gyémánt, L. Kandra, E. Fazekas, N. Ramasubbu, S. Antus
Synthesis of $\beta(1,6)$ -linked *N*-acetyl-D-glucosamine oligosaccharide substrates and their hydrolysis by Dispersin B.
Carbohydr. Res., **346**, 1445-1453, (2011). IF: 2.332
6. Zs. Jakab, **A. Fekete**, M. Csávás, A. Borbás, A. Lipták, S. Antus
Synthesis of a sulfonic acid mimetic of the sulfated Lewis A pentasaccharide
Carbohydr. Res., **350**, 90-93, (2012). IF: 2.332
7. M. Herczeg, E. Mező, L. Lázár, **A. Fekete**, K.E. Kövér, S. Antus, A. Borbás
Novel syntheses of Idraparinux, the anticoagulant pentasaccharide with indirect selective factor Xa inhibitory activity.

Tetrahedron, **69**, 3149-3158, (2013). IF: 3.025

8. M. Kerékgyártó, **A. Fekete**, Z. Szurmai, J. Kerékgyártó, L. Takács, I. Kurucz, A. Guttman

NEOGLYCOPROTEINS AS CARBOHYDRATE ANTIGENS: Synthesis, Analysis and Polyclonal Antibody Response.

Electrophoresis, közlésre elfogadva. IF: 3.303

9. **A. Fekete**, D. Eszenyi, M. Herczeg, V. Pozsgay, A. Borbás

Preparation of synthetic oligosaccharide-protein conjugates of poly- β -(1 \rightarrow 6)-N-acetyl glucosamine.

Glycoconj. J., közlésre benyújtva. IF: 2.117

A kutatási időszak során megjelent szakdolgozatok:

I. Eszenyi Dániel: III. éves kémia BSc szakos hallgató, témavezető: Dr. Fekete Anikó
Oligoszacharid-fehérje konjugátumok szintézise

II. Fekete András: III. éves kémia BSc szakos hallgató, témavezető: Dr. Fekete Anikó
Oligoszacharid szubsztrátok előállítása enzim kinetikai vizsgálatokhoz

III. Hausel Tamás: III. éves biológia BSc szakos hallgató, témavezető: Dr. Fekete Anikó és Dr. Szurmai Zoltán
A redukív aminálás pH függésének vizsgálata

Debrecen, 2013. április 29.

Dr. Fekete Anikó
vezető kutató