

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Myeloma multiplex gliko-biomarkerek azonosítása kapilláris elektroforézissel

Kovács Zsuzsanna

Témavezető: Prof. Dr. Guttman András



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2018.

Myeloma multiplex gliko-biomarkerek azonosítása kapilláris elektroforézissel

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében

az **elméleti orvostudományok** tudományágban

Írta: **Kovács Zsuzsanna** okleveles **biotechnológus**

Készült a Debreceni Egyetem **Molekuláris orvostudomány** doktori iskolája

(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Guttman András, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Dr. Keszler Gergely, PhD

Dr. Kerékgyártó János, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettani Intézet, I. emelet, könyvtár,
2018. május 04.12:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Csősz Éva, PhD

Dr. Idei Miklós, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Prof. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Dr. Csősz Éva, PhD

Dr. Idei Miklós, az MTA doktora

Dr. Kerékgyártó János, PhD

Dr. Keszler Gergely, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épület tanterme, 2018. május 04. 13:30

I. BEVEZETÉS

Régóta ismert, hogy a szénhidrátok fontos szerepet játszanak a különböző jelátviteli és anyagcsere folyamatokban, jelentős szerepük van a fehérjék megfelelő térszerkezetének/konformációjának kialakításában, stabilitásában, minőség ellenőrzésében a sejtfalak kialakításában, illetve a molekuláris felismerésben, valamint az immunitás és gyulladások kialakulásában is szerepet játszanak. Az utóbbi években a poszt-transzlációs módosulások jelentőségének feltárása kapcsán jelentősen növekedett a komplex szénhidrátok analízise iránti érdeklődés. Az O-, és N-glikánok azonos jelentőségűek az élő szervezetekben, mégis az N-glikánokat jóval szélesebb körben tanulmányozzák, mivel a legtöbb O-glikán felszabadításához szükséges specifikus enzimek nem állnak rendelkezésre. Knock-out technikával kezelt egereken bizonyították, hogy a glikoproteinek szénhidrát részének eliminációja súlyos egészségügyi következményekkel járhat. A glikozilációért felelős transzferázok hiánya, vagy mutációja letális a magzati fejlődés során. A glikokonjugátumok szénhidrát tartalma változó, ahogy fehérjénként változó lehet az aktuálisan betöltött glikozilációs helyek száma is (makroheterogenitás). Az antitesteken viszonylag kevés cukor van (2-5%-a az IgG molekula tömegének), míg más glikoproteinek nagymértékben glikoziláltak lehetnek, ilyen a haptoglobin (19%), az eritropoetin (40%), az α 1-acid glikoprotein (45%) vagy a különböző mucinok (40-80%). A glikoproteineknek több glikoformája létezhet a betöltött glikozilezési helyeken, ami széles strukturális diverzitást eredményez (mikroheterogenitás). A glikánok szerkezeti heterogenitása a glikozidázok és a glikozil-transzferázok expressziós szintjétől valamint aktivitásától függ, ami patológias körülmények között megváltozhat. Ezért az átfogó glikozilációs analízis új utakat kínál a biomarker kutatásban, mivel a glikozilációs változások érzékeny indikátorai lehetnek a szervezetben zajló aktuális biokémiai mechanizmusoknak. Glikán biomarkerek segítségével lehetséges a betegségek korai stádiumú diagnosztizálása, emellett elkerülhetővé válhat számos időigényes és invazív eljárás alkalmazása. A glikozilációs változások klinikai jelentőségének felismerése a glikomika, mint új tudományág bevezetésének szükségességét eredményezte. A myeloma multiplex (MM) egy régóta ismert malignus hematológiai betegség, melyben a csontvelő plazmasejtjei kóros mértékben szaporodnak, megzavarva ezzel a csontvelő normális működését, súlyos következményeket vonva maga után. A csontvelőben elszaporodó kóros sejtek miatt a normális csontvelőműködés leáll, emiatt súlyos vérszegénység alakul ki. Myeloma multiplex-ben az akut és krónikus veseelégtelenség is gyakori a malignus plazma sejtek által kiválasztott nagy mennyiségű paraprotein

következtében. A paraproteinek, olyan abnormális immunglobulin fragmentumok, vagy immunglobulin könnyű láncok (kappa, vagy lambda), melyek a szérumban keringenek és a kóros immunglobulin termelő összejt proliferációs klón jelenlétére utalnak. Az MM során lezajló malignus transzformáció megváltoztathatja a fehérjék glikozilációját, ami fokozza a pro-inflammatorikus glikoformák expresszióját. A paraproteinek N-glikozilációs profiljának vizsgálata prognosztikai jelentőségű lehet a myeloma multiplex betegség kezelése során.

A gyógyszeripar növekvő igényt mutat a glikoziláció felé, mivel a fehérje gyógyszerek hatékonyságát jelentősen módosítja a glikoziláció, különösen a monoklonális antitestekét. A modern kapilláris elektroforézis rendszerek könnyen alkalmazhatóak, de a klinikai gyakorlatba történő integrációjuk további fejlesztéseket kíván. Mivel a glikán minta előkészítési eljárás jól robotizálható, lehetőség lenne nagy mennyiségű minta egyidejű és gyors analízisére. Napjainkban széleskörűen elterjedt redukív aminálós derivatizálási módszer nátrium-cianoborohidridet alkalmaz a cukor-fluorofór Schiff-bázis redukálással történő stabilizálására. Ez a jelölési eljárás rendkívül hatékony és könnyen kivitelezhető, ugyanakkor a folyamat során keletkező hidrogén cianid nagy volumenű alkalmazás esetén jelentős problémaforrás. Korábbi tanulmányok mind $[\text{RuCl}_2(\text{mtppms})_2]$ mind $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtppms})_3]$ használata esetén kiváló katalitikus aktivitásról számoltak be hidrogénezési folyamatokban, illetve különféle telítetlen szénvegyületek (pl.: aldehidek) transzfer hidrogénezése esetén, valamint a hangyasav bontásánál.

A gyógyszeriparban egyre jelentősebb a bioterápiás készítmények fejlesztése, ezen belül is különösen a monoklonális antitestek gyártása. Ez gyors klónszelekciót igényel, ami miatt az elválasztási eljárások hatékonyságának és áteresztőképességének fejlesztése jelentős érdeklődésre tart számot. Williams és mtsai. az ezredfordulón jelentősen csökkentették a CE eljárások elválasztási idejét „Sequential Injection Before Analysis” (SIBA) protokolljuk kidolgozásával a felbontási hatékonyság csökkenése nélkül oligonukleotidok analízisére, és növelték a kapilláris elektroforézis rendszerben történő oligonukleotid analízis áteresztőképességét is. A SIBA protokoll alkalmazása esetén a mintakomponenseket elektrokinetikusán injektálták egymás után még az elválasztás megkezdése előtt. Több alternatív minta injektálási és elválasztási megoldást is publikáltak más kutatócsoportok, de ezen módszerek csak egy minta komponens elválasztására voltak alkalmasak.

II. CÉLKITŰZÉSEK

A myeloma multiplex betegek több mint 50%-ában IgG eredetű paraprotein termelődik, a fennmaradó rész közel azonos arányban oszlik meg az IgA és IgD alosztályok között. Ennek ismeretében az volt a célom, hogy az immunoglobulin G paraproteint (IgG) termelő myeloma multiplexben szenvedő betegek totál szérum és a szérum IgG frakció glikozilációját vizsgáljam kapilláris elektroforézis rendszerben lézer indukált fluoreszcens detektálással (CE-LIF), és megállapítsam, hogy a módszer segíthet-e a betegek pontos diagnózisának felállításában a gyakorlati klinikai diagnosztikában.

A $[\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2]$ és $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3]$ komplexekről feltételeztem, hogy alkalmasak lehetnek a glikán jelölés során a redukív aminálási folyamatban kialakuló imin-intermedierek hidrogénezésére (redukciós lépés). A fő N-glikán típusokat jól reprezentáló neutrális humán IgG, a szialilát fetuin és mannozilált szarvasmarha ribonukleáz B N-glikánok alkalmas standardként szolgáltak a módszerfejlesztési vizsgálataim során.

Napjainkra rendkívül robosztus, minimális mintamennyiséget (fmol) igénylő, hatékony elválasztás technikai módszerré vált a lézer indukált fluoreszcens detektálás kapilláris elektroforézis rendszerben. Célul tűztem ki egy újfajta minta injektálási metodika fejlesztését, melyben rövidebb elválasztási idő mellett is megtartható az információ gazdag minta analízis.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1. Etikai engedély

A HBR/052/00437-2/2015 számon nyilvántartott etikai engedély jóváhagyása után a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karának II. sz. Belgyógyászati Intézet, Haematológia Tanszékével, és a Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. sz. Belgyógyászati Klinika, Hematológiai Osztályával együttműködésben egészséges és különböző stádiumú, valamint kezelés előtti és utáni myeloma multiplex-ben szenvedő személyektől gyűjtöttünk szérum mintákat.

III.2. Humán szérum és standard glikoprotein minták

A vizsgálatba 6 kezeletlen, 6 kezelés alatt álló és 6 remissziós myeloma multiplex-es pácienszt vontunk be, illetve 6 egészséges, azonos korcsoportba tartozó nőtől és férfitől gyűjtöttünk kontroll szérum mintát kicsapódást gátló szérumsövekbe (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ). Jelen vizsgálatból kizártuk a fertőző betegségben, vagy krónikus gyulladásos betegségben, illetve egyéb más tumoros elváltozásban szenvedő betegeket, továbbá a kábítószerfüggő pácienseket. A levett vérmintákat azonnal centrifugáltuk 30 percen keresztül 7500 x g-vel, majd a szérum frakciót további felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

A borjúból származó fetuint, a szarvasmarha hasnyálmirigy eredetű ribonukleáz B-t és a humán szérum immunoglobulin G glikoproteinekét a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) cégtől vásároltuk.

III.3. Vegyszerek

A Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) cégtől szereztem be a nagy tisztaságú HPLC vizet, az etilén-diamin-tetraecetsavat, a nátrium-hidrogénkarbonátot, nátrium-dihidrogén-foszfátot, nátrium-hidroxidot, glicin-hidrokloridot, a hangyasavat, az ecetsavat, a ciszteint, a jodoacetamidot és a nátrium-cianoborohidridet (1 M, THF-ben). A G7 puffert és az NP-40 oldatot a New England Biolabs vállalatától vásároltuk (Ipswich, MA). A PNGase F enzimet a ProZyme (Hayward, CA), a papaint az AppliChem (Darmstadt, Germany) cégektől rendeltük. A 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonát fluorofór jelölő anyagot, a maltooligoszacharid létrát és az NCHO szénhidrát elválasztó puffert a SCIEX (Brea, CA) cégtől vettük. A NEB Denaturáló puffer-t, az 1x-Glyco puffer 2-t és az 1% NP-40 oldatot a New England Biolabs (Ipswich,

MA) cégétől szereztük be. Az Agencourt CleanSEQ mágneses gyöngyöket a Beckman Coulter (Indianapolis, IN) cégtől vásároltuk.

III.4. Módszerek

A myeloma multiplex minták analíziséhez kontroll szérum minta alkalmazása mellett kidolgoztam egy módszert a szérumból történő IgG N-glikoziláció vizsgálatára, továbbá egy másik eljárást totál szérumból történő N-glikán analízisre.

A myeloma multiplex vizsgálatban résztvevő betegeket három fő csoportba soroltam:

- 1) kezeletlen betegek – minden frissen diagnosztizált beteg, akik még nem részesültek kezelésben és klinikai vizsgálati eredményeik alapján ISS II-es stádiumba lettek besorolva;
- 2) kezelt betegek – akik a mintavétel idején, valamilyen a myeloma multiplex kezelésére specifikus ellátásban részesültek;
- 3) remisszióban lévő betegek – a mintavétel idején a kezelésnek köszönhetően betegségük tünetmentes fázisában voltak.

A kontroll csoport tagjai egészséges középkorú személyek voltak, melyben a nemek azonos arányban voltak képviselve.

A standard glikoproteinek feldolgozására a kutatócsoportunk által már korábban publikált módszereket alkalmaztam.

III.4.1. Papainos emésztés

Első lépésben a papaint feloldottam 1x-es PBS oldatban 10 mg/ml végkoncentrációban. Második lépésben ebből az oldatból 1 ml-t összekevertem 4 ml 0,2 M EDTA-t és 0,2 M ciszteint tartalmazó 1 x PBS pufferben (pH 6,5). Ebből a reagensből 100 µL-t adtam 100 µL szérum mintához, majd a keveréket 37 °C-on 4 h keresztül inkubáltam. A reakciót 20 µL jodoacetamid hozzáadásával (0,3 M 1 x PBS-ben oldva) állítottam le.

III.4.2. IgG Fc fragmentjének tisztítása

220 µL papain emésztett szérum oldatot használtam minden minta típus esetén (egészséges kontroll, kezeletlen, kezelt és remisszióban lévő MM betegek) a 20 µL térfogatú Protein A affinitás töltetű pipetta hegyekhez (Phynexus, San Jose, CA). 200 µL 1 x kötő puffert (0,7 M NaH₂PO₄, 0,7 M NaCl, pH 7,4) adtam minden szérum mintához, majd 200 µL 0,7 M

NaH₂PO₄ 0,7 M NaCl oldattal (pH 7,4) mostam a Protein A tölteteket és a mintákat átengedtem a mikro-oszloptölteteken. Ezután 200 µL 140 mM NaCl oldattal mostam a mikro-oszlopokat és végül 200 µL of 15% ecetsav oldattal (pH 2,0) eluáltam a felkötődött Fc fragmenseket. Minden eluált mintát 10 kDa szűrőt tartalmazó eppendorf csőbe vittem át és centrifugáltam 10 percig 11270 x g-vel, majd 100 µL HPLC tisztaságú vízzel is mostam 10 percig 11270 x g-vel centrifugálva a maradék ecetsav eltávolítása céljából. Az IgG Fc frakció N-glikán struktúráinak felszabadításához a lentebb leírt PNGase F emésztést alkalmaztam a szűrőn, majd a felszabadított N-glikánokat a később tárgyalt APTS jelölő eljárással derivatizáltam.

III.4.3. IgG κ/λ könnyűláncok tisztítása

A fentebb leírt papain emésztéses keverékből 100 µL adtam minden 100 µL szérum mintához (egészséges kontroll, kezeletlen, kezelt és remisszióban lévő MM betegek), majd 4 óras 37 °C-on történő inkubáció után 20 µL jodoacetamid oldattal leállítottam a reakciót (15 min, 25 °C). Ezután tisztítottam CaptureSelect LC-kappa (Hu) és CaptureSelect LC-lambda (Hu) töltetű affinitás mikro-oszlopokon (20 µL töltet térfogat, PhyNexus, San Jose, CA). 200 µL kötő puffert (1 x PBS) adtam minden szérum mintához, majd ugyanezen oldatból 200 µL-rel kondicionáltam a tölteteket. A minta felkötődése után 200 µL 1 x mosó puffer I-el (0,7 M NaH₂PO₄ 0,7 M NaCl pH 7,4) mostam a pipetta hegybe töltött beadeket. A következő lépésben 200 µL 1 x mosó puffer II-vel (140 mM NaCl) mostam a tölteteket, végül 200 µL 0,1 M glicin-HCl oldattal (pH 2,0) eluáltam az IgG kappa/lambda könnyűláncokat. Minden eluált mintát 10 kDa szűrőt tartalmazó eppendorf csőbe vittem át és 10 percig centrifugáltam 11270 x g-vel, majd 100 µL HPLC tisztaságú vízzel is mostam a mintákat (11270 x g-vel, 10 percig), hogy eltávolítsam a maradék glicin-HCl-t tartalmazó felülúszót. Az IgG κ/λ könnyűlánc frakciók N-glikán struktúráinak felszabadításához a lentebb leírt PNGase F emésztést végeztem el a szűrőn, majd a felszabadult N-glikánokat a későbbiekben részletezett APTS jelölő eljárással derivatizáltam.

III.4.4. Glikoproteinek N-glikán emésztése és cukrok fluorofór jelölése

10 kDa szűrőt tartalmazó eppendorf csőben (VWR, Radnor, PA) 10 µL térfogatra hígítottam minden páciens 1 µL szérum mintáját (egészséges kontroll, kezeletlen, kezelt és remisszióban lévő mielóma multiplexes betegek) HPLC tisztaságú vízzel (Millipore, Darmstadt, Germany). A centrifugált IgG Fc és κ/λ könnyűlánc frakciókat is 10 µL térfogatra hígítottam HPLC

vízzel. Ezután minden mintához 1 μL denaturáló puffert (400 mM DTT, 5% SDS) adtam majd 65 °C-on 10 percen keresztül inkubáltam. Ezekhez a szérum mintákhoz, továbbá az IgG Fc és κ/λ könnyűlánc frakciókhoz a denaturációs lépés után 29 μL NaHCO_3 puffert (20 mM, pH 7,0) és 1 μL PNGase F enzimet (200 mU, 2,5 U/ml, Prozyme) adtam, majd 37 °C-on 16 órán át inkubáltam. Az emésztés végén 100 μL HPLC tisztaságú vizet adtam minden reakciókeverékhez és 7500 x g-vel, 10 percig centrifugáltam. A felszabadított N-glikánokat SpeedVac-ben (Thermo Scientific, Schaumburg, IL) beszárítottam a flouorofór jelöléshez.

A jelölés során 6 μL 20 mM 8-aminopirén-1,3,6-triszulfon savat (APTS) (15% ecetsavban feloldva) és 2 μL 1 M-os nátrium-cianoborohidrid (NaCNBH_3) oldatot (THF-ben oldva) adtam a beszárított N-glikán mintákhoz majd 37 °C-on 16 órán keresztül inkubáltam. A jelölt mintákat CleanSeq mágneses gyöngyök (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) segítségével tisztítottam meg a feleslegesen adott fluorofór festékanyagtól egy korábban már publikált, a laboratóriumunkban kidolgozott eljárás segítségével. A jelölés után tisztított minták azonnal alkalmasak voltak CE-LIF rendszerben történő analízisre. Amennyiben nem analizáltam őket azonnal -20 °C tárolva hosszú időn keresztül stabilak maradtak.

III.4.5. Standard glikoprotein minta előkészítés

A 10 mg/ml-es koncentrációjú fetuin, RNáz B és IgG minták 10 μL -éhez 1 μL denaturáló puffert (400 mM DTT, 5% SDS) adtam, majd 65 °C-on 10 percen keresztül inkubáltam. Ezután 2,5 μL G7 puffert, 2,5 μL NP-40 oldat és 1 μL PNGase F enzimet adtam a mintákhoz és 60 °C, 20 percig emésztettem. A felszabadított N-glikán struktúrákat fluoreszcens APTS festékkel jelöltem, majd mágneses gyöngyök alkalmazása mellett egy korábban már publikált glikán tisztítást végeztem, hogy eltávolítsam a feleslegben adott fluoreszcens festéket a mintákból.

III.4.6. Az $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3]$ cisz,mer-irídium-dihidrido-kloro-trisz(meta-monoszulfonált-trifenilfoszfin nátrium) és a $[\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2]$ ruténium-dikloro-bisz(meta-monoszulfonált-trifenilfoszfin nátrium)-dimer vegyületek előállítása

Az $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3]$ (trisodium cis-mer-chloro-dihydrido-tris(diphenylphosphinobenzene-m-sulfonato) irídium(III)) és a $[\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2]$ (disodium dichloro-bis(diphenylphosphinobenzene-m-sulfonato) ruténium(II)) házilag szintetizált komplexeket a Fizikai Kémiai Tanszék (Debreceni Egyetem, Debrecen) munkatársaitól kaptam a

kísérletekhez. Mindkét komplex nagyon jól oldódik vízben és egyszerűen előállítható az $\text{IrCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ és a $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ halogenid prekursorokból monoszulfonált trifenil-foszfinnel (mtppps) reagáltatva.

III.4.7. Irídium- és ruténium-foszfín komplex alapú APTS jelölés

A kontroll APTS jelölés során 6 μL 40 mM 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsavat (APTS) (20% ecetsavban oldva) és 1,5 μL 1 M-os nátrium-cianoborohidridet (NaBH_3CN) (THF-ben oldva) adtam a beszárított maltooligoszacharid, fetuin, RNase B és humán szérum glikán mintákhoz, majd 55 °C-on, 60 percig inkubáltam a reakciókeverékeket. Az APTS jelölés Ir-, vagy Ru-komplex által közvetített redukív aminálással történt, ahol 6 μL 40 mM APTS (20% ecetsavban oldva), 1,5 μL tömény (98%) hangyasavat és 1,5 μL vízzoldható irídium(III) dihidrid komplexet (5 mg/mL), vagy 1,5 μL vízzoldható ruténium komplexet (5 mg/mL) adtam a beszárított glikán mintákhoz. A reakció keveréket 55 °C-on inkubáltam 10, 20, 40 és 60 percen keresztül. A jelölt mintákat CleanSeq mágneses gyöngyök (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) segítségével tisztítottam meg a feleslegben adott festékanyagtól a kutatócsoportunk által korábban publikált eljárás alkalmazásával. A tisztított minták azonnal alkalmasak voltak a CE-LIF mérésre, de későbbi mérésekhez -20 °C tárolva legalább egy évig eltarthatók voltak.

III.4.8. Kapilláris elektroforézis

A kapilláris elektroforézis méréshez lézer indukált fluoreszcens (LIF) detektorral felszerelt készüléket (P/ACE MDQ, SCIEX, Brea, CA) használtam. A detektálás 488 nm Ar-ion lézerrel való megvilágítással és 520 nm emissziós filter használatával történt. Az elválasztás során 20 cm vagy 50 cm effektív hosszúságú (30 cm vagy 60 cm teljes hosszúságú), 50 μm belső átmérőjű (365 μm külső átmérő) NCHO kapillárisal (SCIEX, Brea, CA) használtam, illetve 50 cm effektív hosszúságú (60 cm teljes hosszúságú), 50 μm átmérőjű BFS kapillárisal is dolgoztam. A kapillárisokat minden esetben NCHO szeparáló géllal töltöttem fel (SCIEX, Brea, CA).

A mintákat 1 psi (6894 Pa) nyomással injektáltam 5 másodpercig. Az elválasztások során fordított polaritású üzemmódban 30 kV elektromos potenciál alkalmazása mellett 25 °C-on, vagy 37 °C-on választottam el a mintakomponenseket.

Szeparációs ablak-függő sorozatos injektálás során fordított polaritású módban, nyomás alapú injektálást használtam 1,2 psi nyomással 0,15 percig injektálva a mintát, vagy három-lépéses

elektrokinetikus injektálást alkalmaztam, ahol először 0,1 psi, 0,1 perc injektáltam HPLC tisztaságú vizet, majd 2,3 kV, 0,1 percig a mintát, végül 0,1 psi, 0,1 percig a szeparáló puffert injektáltam. Az elválasztás fordított polaritású módban történt 30 kV elektromos potenciál alkalmazása mellett. Az adatok gyűjtésére és feldolgozására a 32 Karat 9.1 software-t (SCIEX, Brea, CA) használtam.

III.4.9. Statisztikai analízis

A statisztikai számítások során főkomponens analízist (PCA) és egy változós variancia analízist (ANOVA) alkalmaztam, továbbá meghatároztam a standard hibát az SPSS 22 (IBM Corp.) program alkalmazásával a %-os csúcsterületek alapján, amiket a 32 Karat software (SCIEX, Brea, CA) használatával határoztam meg. A vizsgálati csoportok közötti csúcsintenzitások összehasonlítására Tukey *post hoc* tesztet alkalmaztam. A különbségeket akkor tekintettem szignifikánsnak, ha a P érték 0,05, vagy annál kisebb volt.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1.1. Kontroll személyek és MM betegek szérum N-glikán profiljának összehasonlítása

A munka kezdeteként egészséges kontroll személyek szérum mintáinak N-glikán profilját vizsgáltam. 14 olyan csúcsot azonosítottam, amelyeknek a csúcsterülete $\geq 1\%$ volt. Ezek között egyaránt előfordultak kettő vagy több szíalsavat (1-4), illetve egy szíalsavat tartalmazó (5-8), valamint neutrális (9-14) glikán struktúrák.

A kontroll mintában meghatározott totál szérum N-glikán profilt összevetettem előre megszabott kritériumok alapján a három MM beteg csoport (frissen diagnosztizált, kezelt és remisszió) totál szérum N-glikán mintáival. A kezeletlen, a kezelés alatt álló és a remisszióban lévő MM betegcsoportok jelentős csúcs profilbeli eltéréseket mutattak a kontroll csoporttal összehasonlítva. A frissen diagnosztizált kezeletlen betegcsoportban szignifikánsan különbözött a szíalsavas és neutrális N-glikán struktúrák aránya a kontroll csoporthoz képest. A szíalsavas és neutrális N-glikán struktúrák aránya kontroll totál szérum szinten 2,97 (74,78%/25,22%) volt, míg a kezeletlen betegcsoportban 0,39 (28,16%/71,84%), tehát épp ellentétes irányú volt a szíalsavas/neutrális N-glikánok aránya, ami igen jelentős változás.

IV.1.2. Az Fc és Fab κ/λ könnyűlánc frakciók N-glikozilációs profilja

A kísérletek következő szakaszában papinnal emésztett totál szérumból IgG Fc frakcionálást végeztem Protein A, valamint IgG Fab κ/λ könnyűlánc frakcionálást IgG Fab κ/λ könnyűlánc specifikus affinitás alapú mikro-oszlopokkal.

A totál szérumban található N-glikánok neutrális struktúráinak nagyrésze (~25%) az immunoglobulin frakcióból származik. Felhívnom a figyelmet arra, hogy az ISS II stádiumú betegek esetén a szérum immunoglobulinok mennyisége 5-7 g/dL (albumin szint: 3-5 g/dL), míg egészséges személyek esetén az immunoglobulin szérum szintje 0,7-1,6 g/dL között van (albumin szint: <3 g/dL). Érdekes módon, az IgG Fc frakció N-glikán profilja nem mutatott olyan jelentős változásokat, mint amit totál szérum szinten tapasztaltam, bár a csúcsarány változások hasonló tendenciát mutattak. Az eredmény háttérében az állhat, hogy a szérum glikoproteinek glikozilációs módosulása globális jelenség lehet az MM betegeknél, azaz nem csak a malignus IgG frakciót érinti. A szíalsavas komplex cukrok (1-8 csúcsok) aránya

szignifikáns mértékben csökkent, a neutrális oligoszacharidok (9-14 csúcsok) aránya pedig mind a három vizsgált MM betegcsoportban megnövekedett. A szialsavas és neutrális N-glikán forma arányok a következőképpen alakultak: a kontroll csoportban IgG Fc szialsavas és neutrális N-glikán struktúrák aránya 0,22 (18,26%/81,74%), míg a kezeletlen betegeknél a szialsavas és neutrális N-glikán formák aránya 0,08 (7,49%/92,51%), a kezelt betegek esetén pedig 0,11 (10,19%/89,81%), míg a remisszióban lévő pácienseknél ugyanezen struktúrák aránya 0,14 (12,55%/87,45) volt.

Az IgG Fab kontroll csoport esetén nem találtam szialsavas struktúrákat, amiből következőleg a neutrális N-glikán formák aránya 100%. A frissen diagnosztizált betegek esetén néhány szialsavas glikán struktúrát sikerült azonosítanom, így itt az IgG Fab szialsavas és neutrális N-glikán struktúrák aránya 6,96 (87,44%/12,56%). A kezelés alatt álló és remisszióban lévő MM betegek kappa és lambda könnyűlánc fragmentumainak N-glikozilációs profiljában a kontroll csoporthoz hasonlóan nem detektáltam szialsavas struktúrákat, ennek megfelelően az IgG Fab neutrális N-glikánok mennyisége itt is 100% volt.

IV.1.3. A statisztikai analízis eredményei

A statisztikai analízis során először a totál szérum mintákból kapott adatokat értékeltem ki. Itt a két főkomponens tengely 47,3% és 17,2%-nek adódott, ami a teljes adathalmaz 64,5%-át fedte le és ez az érték elegendő volt ahhoz, hogy az adatokat négy diszkrét, egymástól jól elkülönülő csoportra tudjam bontani (egészséges kontroll, frissen diagnosztizált, kezelés alatt álló és remisszióban lévő MM betegek).

A papainnal emésztett IgG Fc láncok N-glikán profilja esetében a két főkomponens tengely 45,6% és 16,1%-nak adódott, ami a teljes adathalmaz 61,7%-át fedte le. Ez bár az egészséges kontroll és a myeloma multiplex betegek elkülönítését lehetővé tette, de az MM csoporton belüli alcsoportok elkülönítésre már nem bizonyult elegendőnek.

Az egyváltozós variancia-analízis (ANOVA) statisztikai szempontból szignifikáns különbséget mutatott a vizsgált négy csoport átlagos százalékos csúcs alatti terület (PeakArea%) értékeiben a teljes szérum minták következő cukor egységei esetén: A3G(4)3S(6,6,6)3; A2G(4)2S(6,6)2; A2G(4)2S(3,3)2; F(6)A2BG(4)2S(6,6)2; A2[6]G(4)2S(6)1; F(6)A2G(4)2S(3)1; F(6)A2GB(4)2S(3)1; F(6)A2B; F(6)A2[6]G(4)1; F(6)A[3]G(4)1; F(6)A2[6]BG(4)1; F(6)A2G(4)2. Az IgG nehézlánc minták esetén a

F(6)A2G(4)2S(3)1; F(6)A; F(6)A2B; F(6)A[3]G(4)1; F(6)A2[6]BG(4)1; F(6)A2BG(4)2 struktúrák mutattak szignifikáns eltérést.

Ahhoz, hogy meg tudjam határozni a feldolgozott MM minták alapján milyen következtetéseket lehet levonni a teljes populációra nézve, a mintavételi eloszlás jellemzőinek ismeretére volt szükség. Amennyiben a populáció átlag normális eloszlású, az átlag mintavételi eloszlás is normál eloszlást követ, ahol a mintából nyert átlag megegyezik a populációbeli paraméterrel. A standard hiba a fentebb leírt mintavételi eloszlás szórása, tehát azt mutatja meg, hogy amikor több azonos elemű véletlen mintát veszünk egy sokaságból, akkor a minták átlaga mennyire szór a populáció paramétere körül. Minél kisebb a standard hiba értéke annál jobban megközelítettük az átlag tényleges értékét. Számításaim alapján a standard hiba értéke minimális, tehát az eredményeim közelítenek az átlag tényleges értékéhez.

IV.2.1. Irídium- és ruténium-foszfin komplexek hatása a fluorofór jelölés kihozatalára

Az $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtppms})_3]$ és $[\text{RuCl}_2(\text{mtppms})_2]$ vegyületek segítségével transzfer hidrogénezést alkalmaztam ($\text{HCOOH} \rightarrow \text{H}_2 + \text{CO}_2$) a NaBH_3CN -os jelölés alternatívájaként egyszerű és komplex szénhidrátok fluorofórral történő jelölése során a redukív aminálási reakcióban. Standard maltooligoszacharid létrát, valamint PNGase F emésztéssel fetuin, ribonukleáz B és humán szérumból származó N-glikán mintákat jelöltem a fent említett két katalizátorral közvetített transzfer hidrogénezési módszer segítségével. Az APTS jelölés hatékonyságát CE-LIF alkalmazásával kvantitatíve vizsgáltam. A standard maltooligoszacharid létra elektroferogramjaival a különböző redukáló szerek segítségével folytatott fluorofór jelölés hatékonyságát hasonlítottam össze. A mennyiségi értékeléshez a maltopentóz (G5 oligomer) átlagos csúcsmagasságát határoztam meg. Az eredmények alapján az APTS jelölt maltopentóz csúcsintenzitása nagy hasonlóságot mutatott a NaBH_3CN és a $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtppms})_3]$ komplex segítségével történt jelölés során, míg azonos moláris koncentráció esetén a $[\text{RuCl}_2(\text{mtppms})_2]$ komplexes jelölés esetén alacsonyabb csúcsintenzitást kaptam.

IV.2.2. Biológiai minták fluorofór jelölése irídium- és ruténium-komplexek segítségével

A transzfer hidrogénezést, mint alternatív és hatékony redukciós eljárást, biológiai szempontból releváns minták (fetuin, ribonukleáz B és humán szérum) N-glikán struktúráin is megvalósítottam NaBH_3CN , illetve $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3]$ és $[\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2]$ komplexek alkalmazásával. A CE-LIF elektroferogramok igen hasonló jelölési hatékonyságot mutattak a NaBH_3CN és $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3]$ esetében. A $[\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2]$ szintén igen hatékonyan alkalmazható, azonban a fent említett két vegyülethez hasonló jelölési teljesítményhez magasabb (2,5-szeres) koncentrációban kellett alkalmaznom az APTS jelölési reakció során. Kiemelném, hogy a fetuin erősen szialilát N-glikán struktúrái nagyobbak voltak, ami arra utal, hogy ezek a jelölési reakciók stabilabbak, szignifikánsan kisebb a szialsav vesztés. A ribonukleáz B és a humán szérum glikoproteinek N-glikán profiljai esetén mind a három típusú fent említett jelölési eljárás során azonos jelölési hatékonyságot értem el.

IV.3.1. A szeparációs ablak-függő sorozatos injektálás működési elve

A szeparációs ablak-függő sorozatos injektálás (SWDMI) egy olyan multiplex injektálási koncepció a kapilláris elektroforézis elválasztási folyamata során, ahol előre meghatározott időközönként injektáljuk a mintákat miközben az előzőleg injektált minták már részei az elválasztási folyamatnak. Az azonos glikoprotein (IgG N-glikán) mintákat egymás után injektáltam miközben az elválasztási folyamat zajlott. Ilyen sorozatos injektálásra és nagy áteresztőképességű módszerekre, a biotechnológiai szférában fontos klónszelekciós vizsgálatok során van szükség, például az IgG N-glikánok analízise esetén. A tényleges szeparálási lépések száma megegyezik az injektált minták számával. A szeparációs ablak definíció szerint a teljes elválasztás migrációs idő szegmense, ami ahhoz szükséges, hogy elváljon az összes minta komponens egy injektálás utáni elválasztási ciklusban. Minden egyes minta injektálása akkor történik, amikor a korábban injektált minta első csúcsa áthalad a detektoron, figyelembe véve az előre meghatározott szeparációs ablakot. Az SWDMI módszer egyaránt alkalmazható nyomással történő, valamint elektrokinetikus injektálás esetében is. Kísérleteim során kereskedelmi forgalomban is kapható standard IgG fehérjét használtam mintaként, mivel ennek a glikozilációja részleteiben is ismert és ennek kapcsán rendszeresen alkalmazzák validálási eljárások során, továbbá jelentős gyógyszeripari érdeklődés övezi.

IV.3.2. Nyomással történő injektálás SWDMI módban

Négy IgG N-glikán CE-LIF profilját használtam a nyomással injektált SWDMI elválasztás protokoll beállításához. Az analízis 20 cm-es effektív hosszúságú kapillárison történt. Ennél az injektálási módnál az előzőleg injektált minta első csúcsának megjelenésekor (ami ebben az esetben az APTS csúcs 1,28 percnél), megszakítottam az elválasztást és beinjektáltam a következő mintát. A minták beinjektálása 0,15 percen keresztül 1,2 psi nyomással történt, majd az elválasztást 30 kV (0,1 perc ramp time) kapocsfeszültség alkalmazásával folytattam. Miután megjelent az elektroferogrammon a szabad, el nem reagált APTS csúcs, leállítottam az elválasztást és beinjektáltam a második mintát a fenti injektálási paramétereket alkalmazva miután a ráadott feszültség hatására tovább folyt a minta elválasztása. Az első IgG minta glikán struktúráinak megfelelő csúcsok az első ciklus során 2,61 percnél kezdtek megjelenni, és a szeparációs ablak 1,14 perc hosszúságú volt. Kiemelném, hogy a mintakomponensek tényleges elválását nem szakították meg az egymást követő injektálási lépések, így azok rendben elhaladtak a detektor ablak előtt, ennek köszönhetően a csúcsmintázat mindig pontosan azonosítható volt. Ebben az esetben a szeparációs időablak pontos meghatározása (1,14 perc) alapján a második minta APTS csúcsa az első IgG minta utolsó csúcsához közel 3,77 perccel volt látható. A második mintát az első ciklus közepén injektáltam be és az első ciklus a második ciklusú minta elválasztásának közepén fejeződött be. Ekkor injektáltam a harmadik mintát a második minta injektálási paramétereinek megfelelően majd a negyedik mintát akkor injektáltam, amikor a második minta APTS csúcsát a harmadik ciklus során detektáltam. Ennek a koncepciónak az alkalmazásával a négy minta teljes analízise kevesebb, mint 10 percet vett igénybe. Felhívnám a figyelmet arra, hogy négy teljes ciklusban történő elválasztás ugyanerre a négy mintára 36 percet vett volna igénybe.

IV.3.3. Elektrokinetikus injektálás SWDMI módban

Az SWDMI eljárással végzett elektrokinetikus injektálásnak nagyon híg minták analízise esetén van jelentősége, vagy magas viszkozitású elválasztó gél alkalmazásánál. Ez a módszer kiváló jel-zaj arányt eredményezett még alacsony koncentrációjú minták esetében is. Az IgG szénhidrátok mellett szabad APTS látható, melynek nagyobb mennyisége az elektrokinetikus injektálással magyarázható. Az elektrokinetikus injektálás részeként a mintát megelőzően egy ion depletált zónát alakítottam ki HPLC víz elektrokinetikus injektálásával. A minták elektrokinetikus injektálása után nyomásos puffer adagolást alkalmaztam, ami az elválasztás során elkülönítette egymástól a mintákat.

Az SWDMI elektrokinetikus injektálási módjának használatával kapott eredmények kapcsán szeretném kiemelni, hogy elektrokinetikus injektálás esetén a két extra injektálási lépéshez (HPLC víz injektálása és a szeparáló puffer injektálása) kapcsolódó tálcamozgások összességében hosszabb időt igényeltek, mint a nyomással történő injektálás esetén. Ennek tudható be, hogy elektrokinetikus injektálás alkalmazásával 288 percig tartott 96 minta elválasztása, míg ugyanennyi minta analízise csak 240 percet vett igénybe a nyomással történő SWDMI módszerrel. Ezért, ha a minta koncentrációja megfelelő és/vagy alacsony viszkozitású elválasztó puffert használunk az analízishez, akkor a nyomással injektált SWDMI módszer alkalmazása célszerűbb a gyorsabb elválasztási idő miatt.

IV.3.4. Az elválasztási hőmérséklet hatása SWDMI módban

A fentiekben ismertetett sorozatos injektálási kísérletek során az elválasztást 25 °C-os kapilláris hőmérsékleten végeztem. A teljes analízis idő tovább csökkentését a hőmérséklet 37 °C-ra való emelésével tudtam elérni SWDMI módban. Az analízis szempontjából fontos N-glikán minta csúcsok (FA2; FA2(6)G1; FA2(3)G1; FA2G2) ezen a magasabb hőmérsékleten is jól elváltak egymástól. Fontosnak tartom megjegyezni, hogy az IgG N-glikán profil csúcsarányai változatlanok maradtak. Magasabb hőmérsékleten a teljes analízis idő 96 minta esetén 230 perc volt, ami tartalmazta az összes injektálással és elválasztással kapcsolatos tálcamozgásokat. A csúcs terület reprodukálhatósága (RSD) 10,75% volt, míg a migrációs idő reprodukálhatósága 0,5% RSD alatt volt.

V. MEGBESZÉLÉS

V.1. Myeloma multiplexes betegek szérum N-glikozilációja

Vizsgálataim során egészséges kontroll személyek szérum N-glikán mintáit hasonlítottam össze myeloma multiplexes betegek (frissen diagnosztizált kezeletlen, kezelés alatt álló és remisszióban lévő) szérum mintáival. Ennek során a humán szérum teljes N-glikán analízisét végeztem el, illetve papainos emésztés után az IgG fehérjék Fc és Fab κ/λ fragmentumainak az N-glikán jellemzése is megtörtént.

A főkomponens analízis egyértelműen elkülönítette a négy vizsgálati csoportot (kontroll, frissen diagnosztizált kezeletlen, kezelés alatt álló és remisszióban lévő MM betegek) a teljes szérum N-glikozilációs analízis eredményei alapján. A papainnal emésztett IgG lambda és kappa fragmentumainak N-glikozilációs mintázata azonban nem mutatott ilyen jelentős és egyértelmű különbségeket, itt ugyanis csak az egészséges kontroll és a myeloma multiplex betegségben szenvedők közötti eltérés volt egyértelműen igazolható.

A szialsavas és neutrális glikoformák aránya jelentősen módosult szérum N-glikom szinten. Az egyváltozós variancia-analízis (ANOVA) teszt statisztikailag szignifikáns változásokat mutatott ($p < 0,05$) 12 szérum N-glikán esetében, míg IgG fragmentumok szintjén hat N-glikán esetén találtam a szignifikáns eltérést.

Eredményeim alapján megállapítottam, hogy a teljes szérum szintű N-glikozilációs mintázat vizsgálata magasabb információtartalmú, továbbá az eljárás alkalmazása egyszerűbb és gyorsabb, mert nem igényel extra emésztési és tisztítási lépéseket, így klinikai környezetben is egyszerűen alkalmazható.

V.2. Alternatív redukív aminációs eljárások

Szénhidrátok kapilláris elektroforézise során csaknem kizárólag a töltéssel rendelkező fluorofór ágenssel való jelölés alkalmazott. Ennek során a leggyakrabban nátrium-cianoborohidrides redukív aminációs jelölési eljárás alternatívájaként vízzoldható Ir(III) és Ru(II) foszfin komplexek, nevezetesen $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3]$ és $[\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2]$ által katalizált hangyasavas hidrogénezési eljárásokat vizsgáltam. Ezen komplexek könnyen szintetizálhatók és nagy aktivitású katalizátorként használhatók hangyasav hidrogénre és szén-dioxidra történő szelektív bontása során.

Az $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3]$ alkalmazása a redukív aminálási reakció során nagyon hasonló jelölési hatékonyságokat mutatott a hagyományos NaBH_3CN használatának kihozatalával. Ehhez képest a jelentősen olcsóbb $[\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2]$ valamivel alacsonyabb aktivitást

mutatott a NaBH_3CN -el összehasonlítva, azonban nagyobb koncentrációban (2,5 x) alkalmazva elértem a kívánt hatékonyságot.

Nagyon fontos megjegyezni, hogy ezen komplexeket szénhidrát jelölésre alkalmazva elkerülhető az akut mérgező hatású hidrogén-cianid felszabadulás a NaBH_3CN tartalmú reakció keverékből, így nem kell számolni az egészségügyi károsodás kockázatával ipari léptékű alkalmazása során.

V.3. Szeparációs ablak-függő sorozatos injektálási protokoll értékelése

Az új generációs fehérje terápiás szerek gyógyszeripari részesedése napjainkban jelentősen növekvő tendenciát mutat. Ezeknek a biológiai terápiás szereknek több mint a fele monoklonális antitest, melyek glikozilációs profiljának elemzéséhez gyors, nagy áteresztő képességű elválasztási módszerek szükségesek. Munkám során szeparációs ablak-függő sorozatos injektálási módszert dolgoztam ki, mely egyaránt alkalmazható a nyomással történő, valamint elektrokinetikus injektálási módszerek esetén. A módszerek hatásosságát IgG molekulák fő N-glikán struktúráinak kapilláris elektroforetikus analízisével demonstráltam.

A szeparációs ablakot úgy definiáltam, mint az a migrációs idő, amely az összes mintakomponens tényleges elválasztását (a mintakomponens elválasztásához szükséges idő, mely nem tartalmazza a minta beinjektálási idejét) magában foglalja, beleértve a mintában lévő szabad APTS festéket képviselő csúcsot is, amely ez esetben a szeparációs időablak kezdőpontja. Az egymást követő mintainjektálásokat akkor hajtottam végre, amikor az előzőleg injektált minta APTS csúcsa elérte a detektor ablakot. A megközelítés hatékonyságát egysatornás CE rendszer alkalmazásával igazoltam 96 minta analízisével. A módszer egyszerűen alkalmazható és jelentősen lerövidítette a 96 minta analízisének idejét 864 percről 240 percre. Megjegyezném, hogy elektrokinetikus injektálás módban az eljárás hosszabb időt (96 minta esetén 288 perc) igényelt az automata kapilláris elektroforézis készülék extra tálcamozgatása és pozicionálása miatt. A nyomással történő injektálás mód során kevesebb tálcamozgással kellett számolnom, emiatt a teljes folyamat ideje is rövidebb volt (96 minta esetén 240 perc) megközelítve így a minták tényleges elválasztásához szükséges időt. Mivel itt minimális tálcamozgatásra volt szükség az automata kapilláris elektroforézis készülékben, aminek kivitelezése minimális időt vett igénybe és szinte azonnal megkezdődött a minta tényleges analízise. A teljes folyamat idejét tovább tudtam csökkenteni a hőmérséklet emelésével, mely során $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ról $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra növeltem az elválasztási hőmérséklet, így 230 percre sikerült leszorítani a teljes analízis időt 96 minta esetén.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

Myeloma multiplex betegségben szenvedő betegek totál szérum és IgG / paraprotein Fc és Fab κ/λ fragmentumainak N-glikán analízisét dolgoztam ki CE-LIF rendszerben, abból a célból, hogy a módszer alkalmazása segítséget nyújthat-e a betegek pontos diagnózisának felállításához a gyakorlati klinikai diagnosztikában. Kísérleteim során megállapítottam, hogy mind totál szérum N-glikom mind IgG paraprotein Fc és Fab κ/λ fragmentum N-glikán profil szinten is szignifikánsan módosult a szialsavas és neutrális glikoformák aránya. Az adatok statisztikai kiértékelése során egyértelműen magasabb információértékűnek találtam a teljes szérum N-glikozilációs profilokat, mely esetben minden vizsgálati csoport (frissen diagnosztizált, kezeletlen, kezelés alatt álló és remisszióban lévő) egyértelműen elkülöníthető volt. Ezen felismerésnek rendkívüli jelentősége van, ugyanis segítségével a betegek pontos ISS besorolása lehetővé teszi a megfelelő kezelési stratégia kiválasztását, így hosszabb túlélés és jobb életminőség érhető el.

A modern biológiai gyógyszerek glikoformáinak vizsgálata és a glikánok jövőbeli klinikai biomarkerként való alkalmazása kapcsán alternatív fluorofór jelölési módszert dolgoztam ki az egyébként nagy mintaszám esetén a konvencionálisan használt NaBH_3CN -ból fejlődő HCN abszolválására. Vizsgálataim során $\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3$ és $[\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2]$ vegyületek által hangyasavból katalizált transzfer hidrogénezését használtam egyszerű és komplex szénhidrátok APTS-el történő jelölése során redukív aminálási reakcióban. Az $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3]$ közel azonos jelölési hatékonyságokat mutatott a hagyományos NaBH_3CN redukálószer alkalmazásával, míg a jóval olcsóbb $[\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2]$ valamivel nagyobb koncentrációban (2,5 x) adva biztosította a kívánt hatékonyságot. Ezen alternatív jelölésre használt anyagok esetén nem szabadul fel a NaBH_3CN alkalmazásakor keletkező akut mérgező hatású hidrogén-cianid, emiatt környezetbarátabb, továbbá nem kell számolni egészségügyi károsodás kockázatával nagyszámú minta analízise esetén.

Nagy mintaszámú CE-LIF elválasztás esetére dolgoztam ki a szeparációs ablak-függő sorozatos (SWDMI) módszert, mely szignifikánsan csökkentette a teljes analízisidőt 864 percről 240 percre. A szeparációs ablakot úgy határoztam meg, mint az a migrációs időtartomány, amely az összes mintakomponens tényleges elválasztását magában foglalja, beleértve a mintában lévő szabad APTS festéket képviselő csúcsot is, melyet a szeparációs időablak kezdőpontjának tekintettem. Az SWDMI módszer elektrokinetikus injektálás

módban hosszabb időt vett igénybe (288 perc 96 minta esetén). Nyomással történő injektálás során ugyanezen számú minta analízisére kevesebb tálcamozgás miatt a folyamat ideje rövidebb volt, mindössze 240 perc, ami megközelítette a minták tényleges elválasztásához szükséges időt. Tehát a minta injektálási protokoll ebben az esetben minimális tálca mozgási lépést igényelt. 96 mintára a teljes folyamat időt tovább tudtam csökkenteni a hőmérséklet 25 °C-ról 37 °C-ra emelésével, amivel 230 percre sikerült leshorítani a teljes folyamatidőt.



Nyilvántartási szám: DEENK/4/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kovács Zsuzsanna

Neptun kód: Y2L0JQ

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kovács, Z.**, Papp, G., Horváth, H. H., Joó, F., Guttman, A.: A novel carbohydrate labeling method utilizing transfer hydrogenation-mediated reductive amination.
142, 324-327, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.017>
IF: 3.255 (2016)
2. **Kovács, Z.**, Simon, Á., Szabó, Z., Nagy, Z., Váróczy, L., Pál, I., Csánky, E., Guttman, A.: Capillary electrophoresis analysis of N-glycosylation changes of serum paraproteins in multiple myeloma.
Electrophoresis. *38* (17), 2115-2123, 2017.
IF: 2.744 (2016)
3. **Kovács, Z.**, Szarka, M., Szigeti, M., Guttman, A.: Separation window dependent multiple injection (SWDMI) for large scale analysis of therapeutic antibody N-glycans.
J. Pharm. Biomed. Anal. *128*, 367-370, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.002>
IF: 3.255





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

További közlemények

4. **Kovács, Z.**, Szarka, M., Kovács, S., Boczonádi, I., Emri, T., Abe, K., Pócsi, I., Pusztahelyi, T.:
Effect of cell wall integrity stress and RlmA transcription factor on asexual development and
autolysis in *Aspergillus nidulans*.
Fungal Genet. Biol. 54, 1-14, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2013.02.004>
IF: 3.262

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,516

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,254**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai
ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján
elvégezte.

Debrecen, 2018.01.05.

