

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Kovács Zsuzsanna

**Myeloma multiplex gliko-biomarkerek azonosítása kapilláris
elektroforézissel**

DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2018.

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Myeloma multiplex gliko-biomarkerek azonosítása kapilláris
elektroforézissel**

Kovács Zsuzsanna

Témavezető: Prof. Dr. Guttman András



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2018.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
I. BEVEZETÉS	6
II. ELMÉLETI HÁTTÉR.....	8
II.1. Az N-glikoziláció és jelentősége.....	10
II.3. Magas mannóz tartalmú glikoproteinek: Az Ribonukleáz B N-glikozilációja	15
II.4. Főként neutrális cukrokat tartalmazó fehérjék: Az IgG N-glikozilációja	16
II.5. Myeloma multiplex	19
II.6. Glikoziláció szerepe a biomarker kutatásban.....	21
II.7. Hagyományos APTS jelölés és hátrányai	22
II.9. Kapilláris gél elektroforézis	24
II.9.1. Elektroforetikus mobilitás	26
II.9.2. Kapilláris elektroforézis mintainjektálási eljárások	28
III. CÉLKITŰZÉSEK.....	31
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	32
IV.1. Etikai engedély	32
IV.2. Humán szérum és standard glikoprotein minták	32
IV.3. Vegyszerek	32
IV.4. Módszerek	33
IV.4.1. Papainos emésztés.....	34
IV.4.2. IgG Fc fragmentjének tisztítása	34
IV.4.3. IgG κ/λ könnyűláncok tisztítása.....	34
IV.4.4. Glikoproteinek N-glikán emésztése és cukrok fluorofór jelölése.....	35
IV.4.5. Standard glikoprotein minta előkészítés	36
IV.4.6. Az $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3]$ cisz,mer-irídium-dihidrido-kloro-trisz(meta-monoszulfonált-trifenilfoszfin nátrium) (trisodium cis-mer-chloro-dihidrido-tris(diphenylphosphinobenzene-m-sulfonato) irídium(III)) és a $[\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2]$ ruténium-dikloro-bisz(meta-monoszulfonált-trifenilfoszfin nátrium)-dimer (disodium	

dichloro-bis(diphenylphosphinobenzene-m-sulfonato) ruthenium(II) vegyületek előállításá.....	36
IV.4.7. Irídium- és ruténium-foszfin komplex alapú APTS jelölés	37
IV.4.8. Kapilláris elektroforézis	37
IV.4.9. Statisztikai analízis.....	38
V. EREDMÉNYEK	39
V.1.1. Kontroll személyek és MM betegek szérum N-glikán profiljának összehasonlítása	39
V.1.2. Az Fc és Fab κ/λ könnyűlánc frakciók N-glikozilációs profilja	42
V.1.3. A statisztikai analízis eredményei.....	44
V.2.1. Irídium- és ruténium-foszfin komplexek hatása a fluorofór jelölés kihozatalára .	50
V.2.2. Biológiai minták fluorofór jelölése irídium- és ruténium-komplexek segítségével	52
V.3.1. A szeparációs ablak-függő sorozatos injektálás működési elve	53
V.3.2. Nyomással történő injektálás SWDMI módban.....	54
V.3.3. Elektrokinetikus injektálás SWDMI módban	56
V.3.4. Az elválasztási hőmérséklet hatása SWDMI módban	57
VI. MEGBESZÉLÉS.....	59
VI.1. Myeloma multiplexes betegek szérum N-glikozilációja	59
VI.2. Alternatív redukív aminációs eljárások	60
VI.3. Szeparációs ablak-függő sorozatos injektálási protokoll értékelése.....	61
VII. ÖSSZEFOGLALÁS	63
VI. SUMMARY	65
VIII. IRODALOMJEGYZÉK	66
IX. TÁRGYSZAVAK.....	78
X. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	79
XI. FÜGGELÉK.....	80

Rövidítések jegyzéke

ADCC – Antigén függő celluláris citotoxicitás (antigen-dependent cellular cytotoxicity)

AFP – Alpha-fetoprotein

ANOVA – Egyváltozós variancia-analízis

APTS – 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsav

Ar-ion – Argon-ion

Asn – Aszparagin

BFS – Nem bevont falú szilika kapilláris (bare fused-silica)

BGE – Háttér elektrolit (background electrolyte)

CDC – Komplementfüggő citotoxicitás (complement-dependent cytotoxicity)

CE-LIF – Kapilláris elektroforézis lézer indukált fluoreszcens detektálással

CGE – Kapilláris gél elektroforézis (capillary gel electrophoresis)

EDTA - Etilén-diamin-tetraecetsav

EOF – Elektroozmotikus áramlás (electroosmotic flow)

ER – Endoplazmatikus retikulum

Fc – Kristályosítható fragmens (fragment crystallizable)

Fab – Antigén-kötő fragmens (fragment antigen-binding)

GlcNAc – N-Acetil-glükózamin

GU – glükózegység

HCN – hidrogén cianid

HPLC – Nagyteljesítményű folyadék kromatográfia (high performance liquid chromatography)

ID – Belső átmérő (internal diameter)

IgG – Immunoglobulin G

IgG κ – IgG kappa könnyűlánc

IgG λ – IgG lambda könnyűlánc

IMWG – Nemzetközi myeloma munkacsoport (international myeloma working group)

$[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3]$ – cisz,mer-irídium-dihidrido-kloro-trisz(meta-monoszulfonált-trifenilfoszfin nátrium) (trisodium cis-mer-chloro-dihidrido-tris(diphenylphosphinobenzene-m-sulfonato) iridium(III))

ISS – Nemzetközi besorolási rendszer (international staging system)

LOD – Detektálási határ (limits of detection)

MICZE – multiple-injection capillary zone electrophoresis

MM – Myeloma multiplex

mtpms-Na – meta-monoszulfonált-trifenilfoszfin nátrium sója

PCA – Főkomponens analízis (principal component analysis)

PBS – Foszfát-pufferelt oldat PNGase-F – Peptid-N-glikozidáz F

RNase B – Ribonukleáz B

RSD – Relatív standard deviáció (relative standard deviation)

$[\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2]$ – ruténium-dikloro-bisz(meta-monoszulfonált-trifenilfoszfin

nátrium)-dimer (disodium dichloro-bis(diphenylphosphinobenzene-m-sulfonato) ruthenium(II))

SIBA – Analízis előtti sorozatos injektálás (sequential injection before analysis)

SWDMI – Szeparációs ablak-függő sorozatos injektálás

THF – Tetrahidrofurán

I. BEVEZETÉS

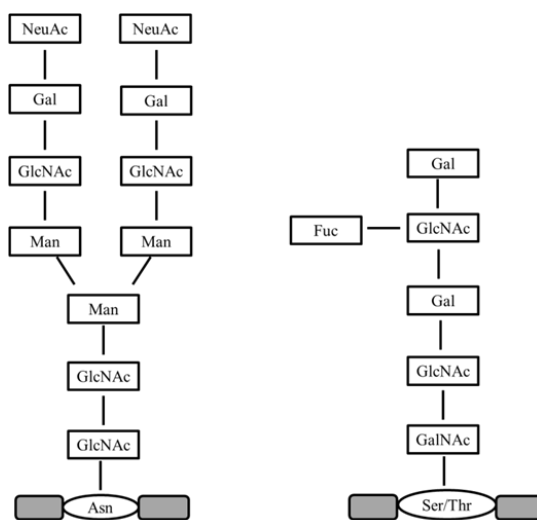
A myeloma multiplex egy régóta ismert malignus hematológiai betegség, melyben a csontvelő plazmasejtjei kóros mértékben szaporodnak, megzavarva ezzel a csontvelő normális működését, súlyos következményeket vonva maga után. A csontvelőben elszaporodó kóros sejtek miatt a normális csontvelőműködés leáll, 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 őssejt proliferációs klón jelenlétére utalnak [1]. A myeloma sejtek nagy mennyiségben termelnek paraproteineket, valamint Bence-Jones fehérjéket (BJP), amelyek abnormálisan magas fehérje szintet eredményeznek a vérkeringésben. Ezek a fehérjék a vesékben kiválasztódva károsítják annak nefron tubulusait. Mindent összevetve, bár a teljes immunglobulin szint szignifikánsan emelkedik MM-ben, ezen immunoglobulinok túlnyomú többsége malignus plazmasejt eredetű, vagy paraprotein, azaz nem hatékony monoklonális forma, ami jelentősen csökkenti a normális immunrendszeri működést és súlyosan károsítja a vesét. A betegek több mint 50%-ában IgG eredetű paraprotein termelődik, a fennmaradó rész közel azonos arányban oszlik meg az IgA és IgD alosztályok között.

A vizsgálataim kedvező eredménnyel zárultak, így a kidolgozott módszer alkalmazható lenne a hétköznapi diagnosztikában. Mivel ez a minta előkészítési eljárás jól robotizálható, lehetőség lenne nagy mennyiségű minta egyidejű és gyors analizésére. Ennek megfelelően munkám másik fő célkitűzése volt, hogy a jelenleg rutinszerűen alkalmazott jelölési eljárásnál környezetkímélőbb és biztonságosabb cukor jelölési módszert dolgozzak ki. Napjainkban széleskörűen elterjedt redukív aminálásos 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 $[\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2]$ mind $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3]$ használata esetén kiváló katalitikus aktivitásról számoltak be hidrogénezési folyamatokban, illetve különféle telítetlen szénvegyületek (pl.: aldehidek) transzfer hidrogénezése esetén [2, 3], valamint a hangyasav bontásánál [4].

Napjainkra rendkívül robusztus, minimális mintamennyiséget (fmol) igénylő, hatékony elválasztás technikai módszerré vált a lézer indukált fluoreszcens detektálás kapilláris elektroforézis rendszerben. Több kutatócsoport is kidolgozott hatékony és gyors minta elválasztási eljárásokat, azonban ezek vagy egyetlen minta komponens elválasztására alkalmasak, vagy nem kapilláris elektroforetikus rendszerekre lettek optimalizálva.

II. ELMÉLETI HÁTTÉR

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 emlős sejtekben két fő glikozilációs típust találhatunk, amellyel a glikánok a fehérjékhez kapcsolódhatnak [11]. Az N-kötött glikánok az aszparagin (Asn) oldallánc nitrogénjén keresztül kapcsolódnak a fehérjéhez ko-transzlációs és poszt-transzlációs módosítások során alakul ki a végleges szerkezetük. Az O-kötött glikánok a szerin (Ser), vagy treonin (Thr) oldallánci hidroxiljának oxigén atomján keresztül kapcsolódnak a polipeptid lánchoz, amely folyamat a Golgi-készülékben végbemenő poszt-transzlációs módosítás. Az O-glikánok általában kisebb méretű struktúrák, míg az N-glikánok komplexebb felépítésűek és többszörösen elágazóak lehetnek (1. ábra) [12]. A membránfehérjéken és az élő szervezetek által szekretált folyadékokban is megtalálható mind a két féle típusú glikán módosítás [13]. Habár, mind a két típusú glikán azonos jelentőségű az élő szervezetekben, az N-glikánokat jóval szélesebb körben tanulmányozták, mivel a legtöbb O-glikán felszabadításához szükséges specifikus enzimek nem állnak rendelkezésre [14]. A fehérjék megfelelő feltekeredésében, stabilitásában és effektor funkcióinak kialakulásában mind a két glikozilációs típus nélkülözhetetlen jelentőségű [15].



1. ábra: N- és O-kötött glikánok jellegzetes szerkezeti felépítése.

Az utóbbi években a poszt-transzlációs módosulások jelentőségének feltárása kapcsán jelentősen növekedett komplex szénhidrátok analízise iránti érdeklődés [5]. A fehérjék glikozilációja egy erősen konzervált folyamat, mely során dolikol-pirofoszfáthoz kötött Man_9Glc_3 oligoszacharid a polipeptid szekvencia aszparaginjához (Asn) kötődik (Asn-X-Thr/Ser, ahol $X \neq \text{Pro}$) ko-transzlációs módosítás során [5, 6]. A folyamat további részében a Man_9Glc_3 egység részben lebomlik és különböző glikozil-transzferázok kialakítják a végleges glikán struktúrát [7, 8]. A glikánok monoszacharid egységekből épülnek fel, melyek számos pozícióban és eltérő kötődési típussal kapcsolódhatnak egymáshoz, így nagyszámú kombinációs lehetőség adott szerkezeti varianciájuk tekintetében [9]. A glikobiológia fő feladata, hogy feltárja a fehérjékhez kapcsolódó szénhidrátok struktúrájának jelentőségét és vizsgálja, miként vesznek részt ezek az oligoszacharidok a biológiai folyamatokban [10]. A glikánok funkciója rendkívül sokféle lehet, de általában két nagy csoportba soroljuk őket:

- a glikánok által közvetített belső funkciók:
 - a sejtfa struktúrájának fő alkotóelemei
 - és részt vesznek az extracelluláris molekulafelismerésében
 - befolyásolják a fehérje stabilitást és oldhatóságot

- glikán kölcsönhatás alapú, közvetített funkciók:
 - sejt-sejt és sejt-mátrix kölcsönhatások közvetítése és szabályozása
 - glikán struktúrák általi információ közvetítése intra- és extracelluláris szinten
 - intra- és extracelluláris jelátvitel

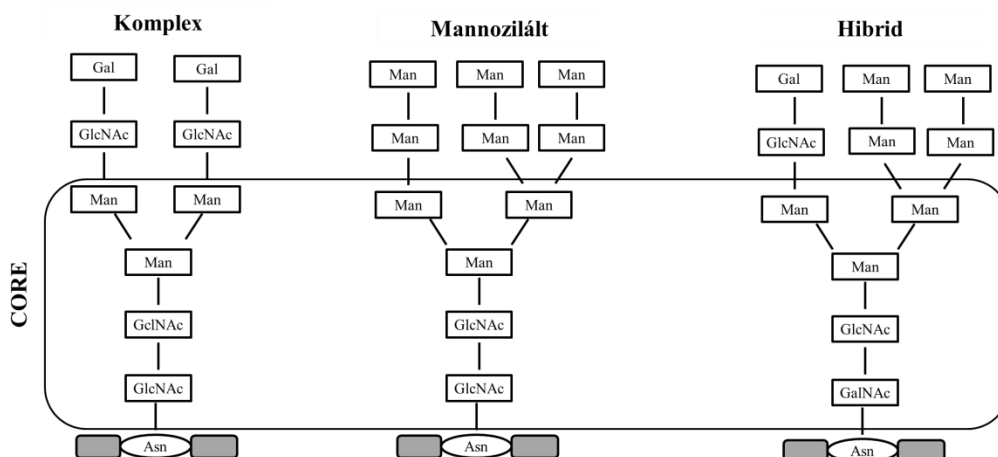
Habár, az O-, és N-glikánok azonos jelentőségűek az élő szervezetekben, az N-glikánokat jóval szélesebb körben tanulmányozták, mivel a legtöbb O-glikán felszabadításához szükséges specifikus enzimek nem állnak rendelkezésre [11]. A fehérjék megfelelő feltekeredésében, stabilitásában és effektor funkcióik kialakulásában mind a két glikozilációs típus nélkülözhetetlen jelentőségű [12].

A fehérjék primer polipeptid szekvenciája közvetlenül a génekben kódolt, míg a glikán struktúrákat felépítő monoszacharid egységeket kötés-specifikus glikozil-transzferázok építik fel, tehát a glikánok másodlagos géntermékeknek tekinthetők [5]. Ugyanakkor a szénhidrát egységeket egymáshoz kapcsoló, és így a glikánokat létrehozó, specifikus enzimek szerkezete bár a genomban kódolt, expressziójuk az adott biológiai környezettől függhet [13]. Knock-out technikával kezelt egereken bizonyították, hogy a glikoproteinek szénhidrát részének eliminációja súlyos egészségügyi következményekkel járhat [14]. A glikozilációért felelős transzferázok hiánya vagy mutációja letális a magzati fejlődés során [15]. A glikokonjugátumok szénhidrát tartalma változó, ahogy fehérjénként változó lehet az aktuálisan betöltött glikozilációs helyek száma is (makroheterogenitás) [16]. Az antitesteken viszonylag kevés cukor van (a teljes tömegük kevesebb, mint 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%) [17]. A glikoproteineknek több glikoformája létezhet a betöltött glikozilációs helyeken, ami széles strukturális diverzitást eredményez (mikroheterogenitás) [18]. 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 [19]. Glikán biomarkerek segítségével lehetséges a betegségek korai stádiumú diagnosztizálása, emellett elkerülhetővé válhat számos időigényes és invazív eljárás alkalmazása [20]. A glikozilációs változások klinikai jelentőségének felismerése a glikomika, mint új tudományág bevezetésének szükségességét jelentette [21].

II.1. Az N-glikoziláció és jelentősége

Az N-glikoziláció az egyik leggyakoribb poszt-transzlációs módosítás az eukarióta sejtek membrán és szekretált fehérjéin egyaránt [22]. Három aszparaginhoz kötött glikán típust különböztetünk meg, melyek (2. ábra) mindegyike tartalmazza a közös trimannozil-Kitobióz alap struktúrát, vagy más néven core struktúrát. A komplex típusú glikánok nagymértékben elágazóak lehetnek (multi-antennás struktúrák), ahol a core struktúrához

kapcsolódó elágazó szénhidrát karok különböző monoszacharid egységeket tartalmaznak. A mannoz típusú glikánok esetén a core struktúrához kapcsolódó karokat mannoz egységek építik fel [23], míg a hibrid típusú glikánok esetén a $\text{Man}\alpha 1-3$ kart komplex, a másikat $\text{Man}\alpha 1-6$ irányban pedig csak mannoz tartalmú egységek építik fel [5].



2. ábra: Komplex, mannoszilált vagy hibrid típusú N-glikánok sematikus ábrázolása.

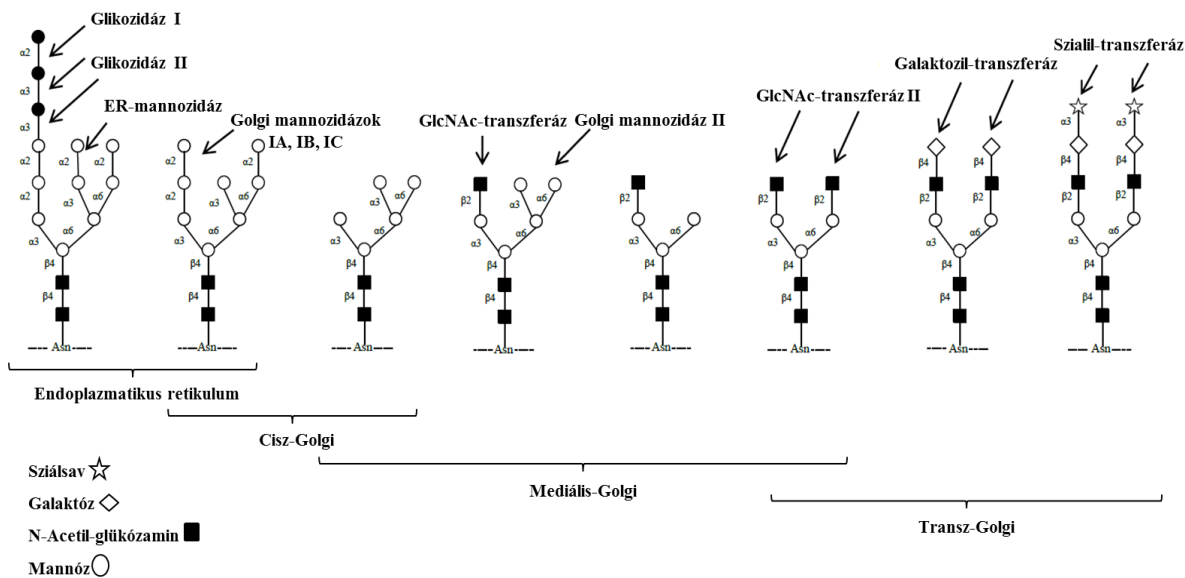
Az N-glikánok bioszintézise a következő három nagy lépésben történik:

- Dolicol-kötött prekursor oligoszacharid szintézise
- A prekursor oligoszacharid kötése az épülő polipeptid lánkra
- Az oligoszacharid végleges szerkezetének kialakulása a Golgi-készülékben

A glikoproteinek ko-transzlációosan kötött Man_9Glc_3 oligoszacharid csoportja poszt-transzlációosan módosul és így alakul ki az endoplazmatikus retikulum (ER) lumenében, illetve a Golgi készülékben a végleges cukor struktúra. Az ER lumenében kapcsolódnak a fehérjéhez a prekursor oligoszacharidok, majd a szénhidrát lánc processzálása a Golgi készülékben fejeződik be (3. ábra).

Az N-glikoziláció folyamatának első lépése az N-Acetil-glükózamin (GlcNAc) egységek dolicholhoz kötődése. A dolichol egy ismétlődő izoprén egységekből álló lipid molekula, ami az ER membránjához kötött. A cukormolekulák pirofoszfát kötéssel keresztül kapcsolódnak a dolicholhoz [9] és az oligoszacharid lánc különböző cukormolekulák hozzáadásával lépcsőzetes módon kibővül, kialakítva egy prekursor oligoszacharid struktúrát. Ennek a prekursor oligoszacharidnak a képződése két fázisban történik: az első fázis az ER citoplazmatikus oldalán zajlik, míg a második fázis az ER lumen részében megy végbe. A kész prekursor molekula 2 GlcNAc-ból, 9 mannozból és 3

glükóz molekulából tevődik össze és készen áll az épülő polipeptid láncre történő átvitelre. Ezt a reakciót a dolichol és a szénhidrát molekula közötti GlcNAc-pirofoszfát kötés hasításából felszabaduló energia biztosítja. Az oligoszacharil transzferáz enzim felelős azért, hogy felismerje a konszenzus szekvenciát és a prekursor glikánt az épülő polipeptid lánc megfelelő konszenzus szekvenciájához kösse. Az N-glikoziláció tehát egy ko- és poszt-transzlációs módosítás eredménye. Miután a glikán prekursor a képződő polipeptidre került, exoglikozidáz enzimek (ami csak a glikán nem redukáló végén hasít [9]) levágják a három glükóz egységet a szerkezetről. A glikozidáz egy exoglikozidáz (3. ábra) [9]. Erről a glükóz hasítási lépésről azt feltételezik, hogy minőségellenőrzési lépésként funkcionál az ER-ben feltekeredő fehérje kialakulásakor. Helyes fehérje szerkezet esetén a glikozidáz I és glikozidáz II eltávolítják a glükóz egységeket. Az összes glükóz egység eltávolítása jelzi, hogy a fehérje készen áll az ER-ből a Golgi-készülékbe történő átszállításra. Ha azonban a fehérje nem megfelelően tekeredett fel, a glikozidázok nem aktiválódnak, és így a glikoprotein nem hagyhatja el az endoplazmatikus retikulumot. Normál esetben egy chaperone fehérje (calnexin/calreticulin) a részlegesen feltekeredett fehérjéhez kötődik, hogy segítse a fehérje teljes feltekeredését és továbbítását. A következő lépés a Golgi-ban lévő fehérje cukorvázának további módosítása. Ezeket a módosításokat glikozil-transzferázok és glikozidázok katalizálják (3. ábra). A cisz-Golgi készülékben egy sor mannozidáz enzim eltávolítja a felesleges mannóz egységeket, míg a Golgi mediális részében a glikozil-transzferázok különféle cukor egységeket adnak a core glikán szerkezetéhez, ami végül a három leggyakoribb fent említett glikán típust eredményezi, tehát a magas mannóz, a hibrid vagy a komplex glikánokat. Habár a fehérje glikoziláció mechanizmusa már az 1980-as években ismert volt, a folyamat biológiai jelentősége még mindig nem teljesen egyértelmű.

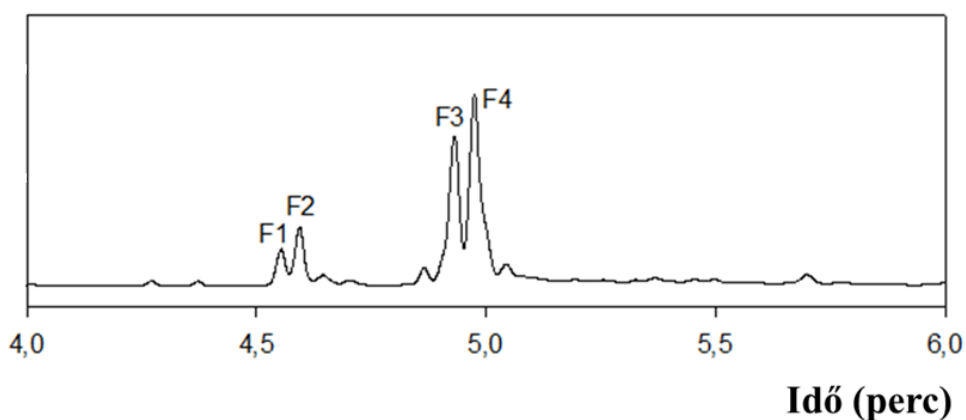


3. ábra: N-glikán érés sematikus ábrázolása.

A glikánok biomarkerként történő felhasználása mellett, napjainkban számos kutatócsoport foglalkozik a glikoproteinek cukor szerkezetének befolyásolásán keresztüli autoimmun és tumor ellenes hatások lehetőségének vizsgálatával. De Freitas és munkatársai *in vitro* humán kolorektális karcinóma sejteken vizsgálták a swainsonin és tunikamicin hatóanyagok hatásait az N-glikán bioszintézis során, mivel ezek gátolják a glikánok képződését [24]. Eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az N-glikán bioszintézis gátlása fokozta a kemoterápiás szerek hatékonyságát [24], továbbá igazolták, hogy az N-glikoziláció tunikamicinnel történő gátlása fokozta az E-kadherin mediált sejt-sejt adhéziót és gátolta a differenciálatlan karcinóma sejtek proliferációját [25]. A swainsonin a tunikamicinnél kevésbé toxikus hatóanyag és a Golgi α -mannozidáz kompetitív inhibitora. Állatkísérletekkel igazolták, hogy a swainsonin mind *per os*, mind *parenterális* módon alkalmazva csökkentette a tumorok növekedését, gátolta a metasztázisok kialakulását, és növelte a túlélés időtartamát a sebészi tumor eltávolításon átesett egereknél [26, 27]. A swainsonin a humán melanóma *MeWo* tumor xenograftok növekedését is gátolta egerekben [28]. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a glikozilációnak jelentős szerepe van a malignus sejtek osztódásában és metasztatizáló képességében, továbbá a tumoros sejtek burjánzása fékentartható a rákos sejtek glikozilációjának megváltoztatásával egérben. A humán glikoziláció pontos szerepének és működésének feltérképezése után a glikozilációt befolyásoló készítmények sikeres daganat ellenes szerekké válhatnak.

II.2. Magas sziálsav tartalmú glikoproteinek: A Fetuin N-glikozilációja

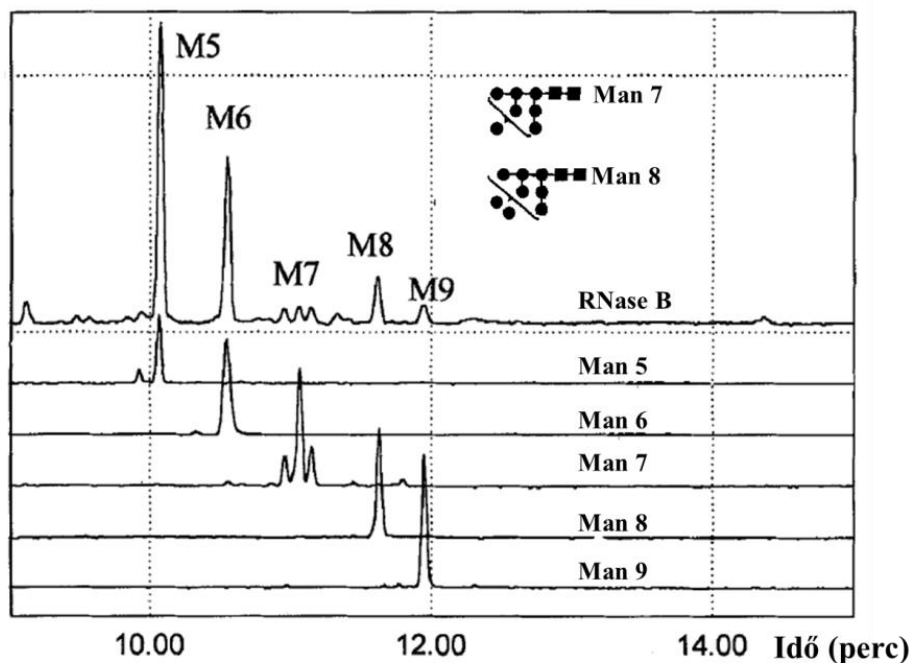
A magzati szarvasmarha fetuin N- és O-kötött glikán stuktúrákat is tartalmazó, ~ 48.4 kDa tömegű fehérje, amely a májban szintetizálódik és onnan szekretálódik a véráramba. A fetuin a hordozófehérjék családjába tartozik, amelyek a véráramban lévő számos metabolit szállítását és rendelkezésre állását biztosítják. A fetuin nagy mennyiségben van jelen a magzati vérben, innen ered a neve "fetuin" (fetus latinul magzat). A fetális marhaszérum több fetuint tartalmaz, mint albumint, míg az állat kifejlett korára megfordul az arányuk. A fetuin szerkezetét részletesen vizsgálták számos módszerrel többek között tömegspektrometriával [29, 30], nagy nyomású folyadék kromatográfiával (HPLC) [31] és kapilláris elektroforézissel (CE) [32] is. Ezek a tanulmányok azonos következtetésekre jutottak, miszerint a fehérje erősen szialilált N-glikán struktúrákat és O-glikánokat is tartalmaz az Asn99, Asn156, Asn176, és Ser271, Thr280, Ser282 és Ser341 pozíciókban. A 4. ábra a fetuin N-glikánjainak kapilláris elektroforetikus (CE-LIF) analízisét mutatja be lézer indukált fluoreszcens detektálással.



4. ábra: APTS jelölt fetuin N-glikán struktúrák (CE-LIF elektroferogram)
(F1: A3S(6)1G3S(6,6,3)3; F2: A3S(6)1G3S(3,6,3)3; F3: A3G3S(6,6,3)3; F4:
A3G3S(3,6,3)3.

II.3. Magas mannóz tartalmú glikoproteinek: Az Ribonukleáz B N-glikozilációja

A szarvasmarha-hasnyálmirigy RNáz B egy globuláris glikoprotein, melynek molekulatömege ~15 kDa. Az RNase B egyetlen doménből áll és csak magas mannóztartalmú N-kötött glikánokat tartalmaz az Asn34 pozícióban. Ezen a ponton a core struktúrán keresztül változó méretű, 5-9 mannózt tartalmazó szénhidrát kapcsolódhat a fehérjéhez. Ez a jelenség az N-glikozilezési hely mikroheterogenitását eredményezi és a fehérje számos különbözően glikozilált variánsként fordul elő (5. ábra) [33]. A magas mannóz tartalmú cukrok összetételét és szekvenciáját számos analitikai módszerrel széles körben tanulmányozták, például MS [34], H-NMR [35], HPLC [36] és kapilláris elektroforézis [37]. Ezen vizsgálatok gyakorlatilag azonos következtetésekre jutottak és az eredmények megegyeztek abban, hogy a különböző polimerizációs fokú mannóz struktúrák milyen arányban vannak jelen a felszabadított glikán keverékben.



5. ábra: Ribonukleáz B APTS jelölt glikán struktúráinak CGE-LIF analízise (Man; M=mannóz) [37].

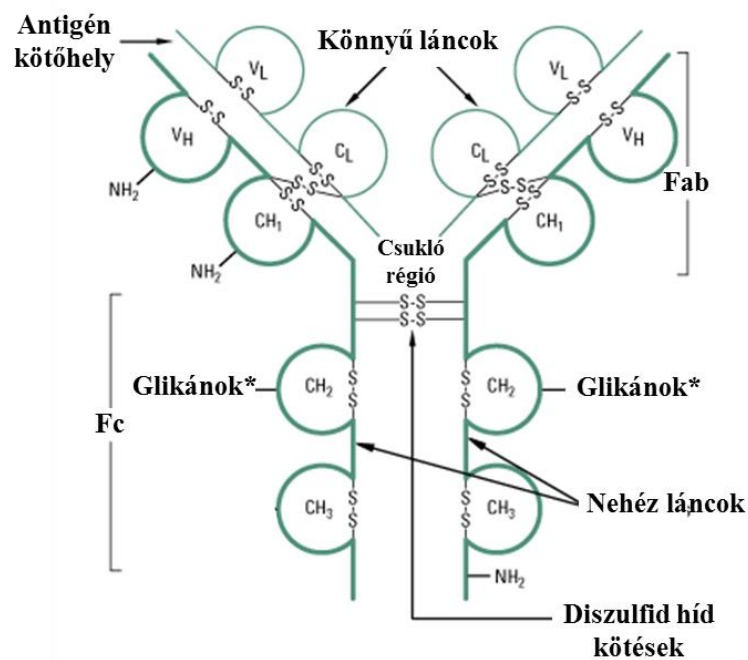
II.4. Főként neutrális cukrokat tartalmazó fehérjék: Az IgG N-glikozilációja

Az immunglobulinok az adaptív immunrendszer fő szekréciós fehérjéi és legfontosabb feladatuk a szervezet külső kórokozókkal szembeni védelme [38]. Emberben az immunoglobulinok 5 alosztálya ismert, úgymint IgA, IgD, IgE, IgG és IgM [39]. Mindegyik alosztály glikozilált lehet az Fc (kristályosítható fragmens), vagy az Fab (antigén-kötő fragmens) részen, de a két egység egyidejűleg is tartalmazhat szénhidrátokat [40]. Az Fc és az Fab rugalmas csuklórégió keresztül kapcsolódik az IgG, IgA és IgD típusok esetében, míg az IgM és IgE esetén egy merevebb domén keresztül valósul meg [40]. Minden immunoglobulin két azonos 50-77 kDa-os, osztályonként specifikus nehézláncból áll (öt típusa van: γ , δ , α , μ és ϵ) és egy, vagy több diszulfid híd révén kapcsolódnak [41]. A nehézláncok szintén diszulfid híd kötéssel kapcsolódnak a 25 kDa-os könnyűláncokhoz. Emberben két típusú könnyűláncot ismerünk a λ és κ könnyűláncokat [42]. A nehéz láncok moláris tömegének 2-3%-át adja a glikoziláció (IgG: 150 kDa), de legfeljebb csak 12-14% az Fab fragmensén glikozilált immunglobulinok esetén is (IgM, IgD, IgE) [43]. Fontosnak tartom megjegyezni, hogy míg a nehézláncon az Asn 297 pozícióban egy konzervált N-glikán kötőhely van, addig a könnyű láncokon nincsenek konzervált kötőhelyek.

Emberben az IgG molekulát γ nehézláncok és lambda (λ) vagy kappa (κ) könnyűláncok építik fel. A γ lánc 450 aminosavat tartalmaz. További besorolás négyféle IgG alosztályt különböztet meg: IgG1 (66%), IgG2 (23%), IgG3 (7%) és IgG4 (4%), melyek γ lánc szekvenciájukban és a diszulfid hidak eloszlásában különböznek egymástól [44]. Egészséges emberben az IgG1 szérum immunoglobulin átlagos koncentrációja 10-15 mg/ml. Az IgG1 molekulák egy konzervált N-glikozilációs helyet tartalmaznak az Fc régióban (Asn 297), de mint fentebb már említettem, az Fab régióban is előfordulhat variábilis N-, vagy O-glikoziláció [45]. A közelmúltban bevezetésre került monoklonális antitest alapú terápiás gyógyszerek hatásossága révén széles körben tanulmányozott az IgG molekula és annak glikozilációja (6. ábra) [46]. Az Fc fragmentum C_H2 doménjén a fent említett Asn 297-es konzervált pozícióban különböző glikoformák lehetnek jelen [47], melyek még a két szálon lévő struktúrájukban is különbözhetnek. A glikoformák nagy heterogenitása a különböző monoszacharid építőelemek pozicionális és kötési változatosságai miatt alakul ki. Leggyakrabban komplex biantennás struktúrák kapcsolódnak az Fc fragmentumhoz, melyek α 1-6 core fukoziláltak is lehetnek. Az

antennák N-acetil-glükózamin, galaktóz, fukóz és szialsav egységeket tartalmazhatnak, emiatt akár 32 különféle struktúra is kialakulhat [48]. Az IgG Fc glikánok jelenléte és megfelelő szerkezete elengedhetetlen az optimális Fc γ receptor kötődéshez [49], mely az effektor funkciók alapját képezi.

IgG Fc glikánok minden alosztály receptor és effektor funkciói esetén szükségesek az optimális antitestkötéshez, így ezek az IgG-k védenek a kórokozókkal szemben és szabályozzák a terápiás antitestek számos tulajdonságát [50]. Az IgG Fc negyedleges szerkezetét és termodinamikus stabilitását az erősen konzervált Asn-297 glikánok biztosítják [51]. A terminális monoszacharid egységtől függően a glikán befolyásolja a fehérje alapvető funkcióit, például a szervezetben keringési időt, a komplementfüggő citotoxicitást (CDC), az antigén függő citotoxicitást (ADCC) és a gyulladáscsökkentő hatást [52-55].



6. ábra: IgG sematikus ábrája és konzervált glikozilációs helye (*Asn 297 pozícióban konzervált szénhidrát kötőhely).

Az Fc szialiláció biztosítja a gyulladásgátló hatást α 2,6-kötött szialsavak esetén. A core GlcNAc-hoz kapcsolódó α 1,6-kötött fukóz csökkenti az ADCC-t, mivel a core fukoziláció nélküli IgG nagyobb affinitással kötődik az Fc γ RIIIa receptorjához. A terápiás IgG ADCC

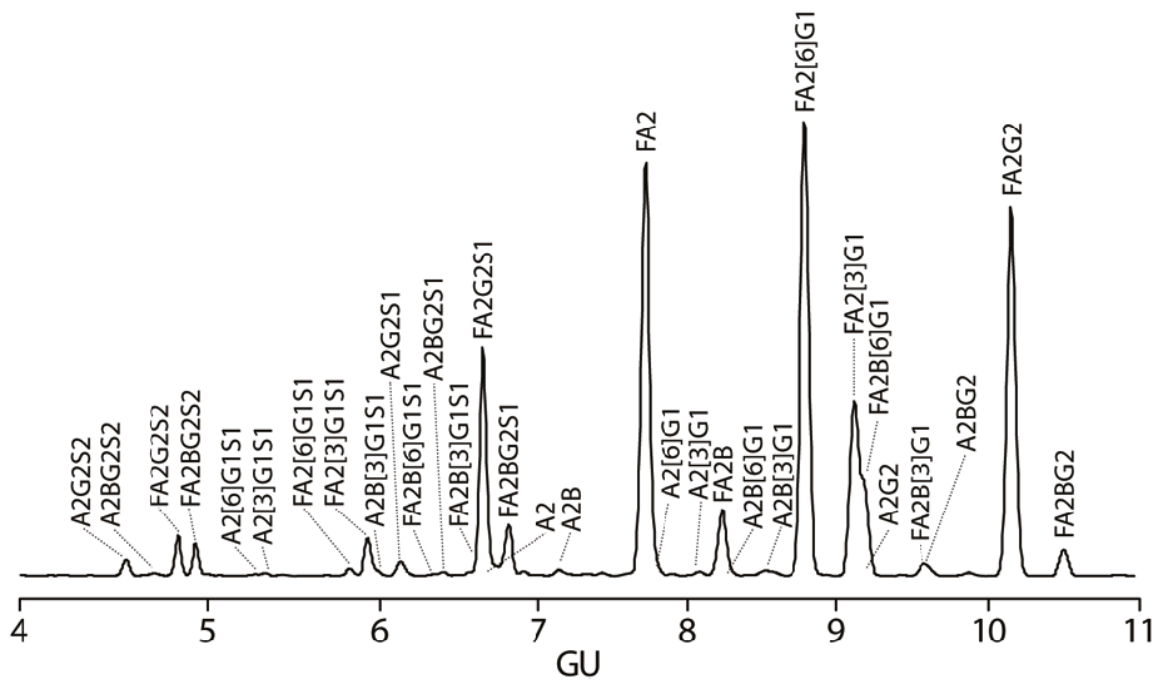
aktivitásának javítása érdekében számos stratégiát fejlesztettek ki az antitest core fukóz tartalmának csökkentésére, például csökkentik a fukozil-transzferáz gén expreszióját, vagy túltermeltetik a GnTIII enzimet, amely a bisecting GlcNAc kötéséért felel [56]. A humán szérum IgG glikozilációja változó mértékben módosulhat olyan tényezők hatására, mint az életkor, a terhesség, a gyulladásoos betegségek és a tumoros elváltozások [57].

Az IgG szénhidrát szerkezetében bekövetkező módosítások jelentősen befolyásolják a fehérje egyes tulajdonságait. Az IgG CDC aktivitása felére csökkent galaktoziláció hiányában, [58-60]. Más kutatócsoportok azt figyelték meg, hogy magas mannóz tartalmú cukrok jelenléte (Man5-Man9) csökkenti a szérumban keringő IgG fél-élet idejét [61, 62] mivel kikötődnek a májban található mannóz kötő lektinekhez.

A glikánok töltés/hidrodinamikai térfogatuknak megfelelően különböző sebességgel vándorolnak a nagyobbak lassabban, a kisebbek vagy több töltéssel rendelkezők gyorsabban. A csúcsok elválása alapján azonosítani lehet egy ismeretlen szénhidrát struktúrát, mivel lineáris glükózoligomerek esetén a migrációs idő a monomer egységek számával arányosan növekszik. A lineáris glükóz oligomerekben lévő monomerek számát glükózegységben (GU) fejezik ki. A GU számítását a következő egyenlet írja le:

$$GU_x = \frac{G_n + MT'_x - MT_n}{MT_{n+1} - MT_n} \quad (eq 1)$$

ahol GU_x : az ismeretlen glikán glükózegysége, G_n : az X glikánt megelőző homooligomer glükózegysége, az MT'_x : az ismeretlen glikán korrigált migrációs ideje, MT_n : az X glikánt megelőző homooligomer migrációs ideje, MT_{n+1} : az X glikánt követő homooligomer migrációs ideje. A glikánok rendkívüli sokfélesége miatt a már azonosított struktúrák publikálása és adatbázisban való gyűjtése igen nagy jelentőségű. Az elmúlt évtizedben számos kezdeményezés volt átfogó adatbázisok létrehozására, ilyen például a Consortium for Functional Glycomics, a Glycosciences.de, a BCSDB, a GlycoSuiteDB, a GlycoBase és a EUROcarbDB, melyek célja a glikánok szerkezeti azonosításának megkönnyítése [48, 63]. Alább egy standard IgG fehérje kapilláris elektroforézis rendszerben elválasztott N-glikán profilja látható (7. ábra), az azonosított struktúrák feltüntetésével [48].



7. ábra: Immunoglobulin G N-glikozilációs elektroferogramja kapillaris elektroforézis rendszerben lézer indukált fluoreszcens detektálással [48].

II.5. Myeloma multiplex

A myeloma multiplex (MM) a plazmasejtek rosszindulatú klonális proliferációja, és napjainkban is a gyógyíthatatlan betegségek közé sorolják. A betegség diagnózisát a legutóbbi nemzetközi myeloma munkacsoport által meghatározott (IMWG)-kritériumoknak megfelelően állítják fel, amely időigényes és egyben bonyolult feladat főképp az aspecifikus klinikai tünetek miatt [64, 65]. A leggyakrabban használt eljárások a myeloma multiplex diagnosztizálására a laboratóriumi, képalkotó és csontvelő biopsziás vizsgálati eredmények kombinációját alkalmazzák a diagnózis felállításához [65, 66]. A betegség tanulmányozása során számos onkogén mechanizmust fedeztek fel, amelyek befolyásolják a transzlációs mechanizmusokat, a hiszton metilációt, a véralvadást és a paraprotein képződését [67]. Az N-glikozilációban bekövetkező változások jelentős szerepet játszhatnak különböző humán malignus betegségek során, ideértve a myeloma multiplexet [68-70], ahol igazolt, hogy a paraproteineket specifikus glikán profilok jellemzik [71]. A paraproteinek, olyan abnormalis immunoglobulin fragmentumok, vagy immunoglobulin könnyű láncok (kappa, vagy lambda), melyek a szérumban keringenek és a kóros immunoglobulin termelő összejt proliferációs klón jelenlétére utalnak [1]. Rendkívül

fontos tény, hogy a paraproteinek glikozilációja, illetve azok profiljának változása a betegség előrehaladását jelezheti [72]. Fiziológias körülmények között az IgG1 molekulák N-glikozilációja a C_H2-domén erősen konzervált Asn297 pozícióban található az Fc régióban. Az Fc-fragmens ezen konzervált N-glikozilezési helyén kívül a keringő humán IgG fehérjéknek csak körülbelül 20-30%-a glikozilált a Fab-fragmentumon is [73, 74].

A malignus transzformáció megváltoztathatja a fehérjék glikozilációját, ami fokozza a pro-inflammatorikus glikoformák expresszióját [5]. A csontvelő folliculáris limfóma sejtjeinek szomatikus mutációi azt mutatták, hogy az expresszált IgG molekulák nehéz és könnyű láncában nagyszámú N-glikozilációs módosulás alakul ki, ami arra utal, hogy a glikánoknak szerepe lehet a tumor patogenezisében [75]. Kutatások továbbá igazolták, hogy myeloma multiplex betegek szérumban többszörösen szialilált biantennáris glikánok vannak jelen az IgG könnyű láncban [74], és habár funkciójuk még ismeretlen, az IgG variábilis régiójának megnövekedett glikozilációja összefüggésben lehet a plazmasejt proliferációval. Glavery és munkatársai bizonyították, hogy csökken a megtapadási és a metasztatizáló képesség a ST3GAL6 szialil-transzferáz génkiütött MM csontvelő sejtekben [76]. Könnyű lánc myeloma multiplex (LCMM) során a core fukoziláció csökkenését, a bisecting glikoformák megjelenését és a glikoproteinek fokozott szialiláltságát figyelték meg [77]. A közelmúltban egy írországi kutatócsoport is alacsony galaktoziláltságú és fukoziláltságú glikozilációs profilt talált MM betegeknél [78]. Az MM betegeket az IMWG kritériumok mellett a szérum béta-2-mikroglobulin (β2-M) és az albumin szint meghatározása után diagnosztizálják, és felállítják a betegség prognózisát [64, 79]. Bár a nemzetközi besorolási rendszer (ISS) besorolást csak 2005 óta alkalmazzák, bizonyítottan hatékonyabb a myeloma három szakaszába történő besoroláskor. Ezek a szakaszok a várható túlélési rátákat próbálják előre jelezni, és ennek kapcsán hatékonyabb myeloma kezelési stratégiákat javasolnak [80].

A paraproteinek N-glikozilációs profiljának vizsgálata prognosztikai jelentőségű lehet a myeloma multiplex betegség kezelése során melyet leggyakrabban folyadék kromatográfia (LC), kapilláris elektroforézis (CE), mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) és tömegspektrometria (MS) [71, 81-85] segítségével vizsgálnak. Ezen módszereknek számos előnye van, ugyanakkor mindig a céloknak megfelelően kell a vizsgálati eszközt választani, mert mindegyiknek meg van a maga hátránya is. Ilyen probléma lehet, hogy nagy minta mennyiséget igényelnek (NMR), vagy bonyolult a hétköznapi alkalmazásuk

(MS). A CE-LIF előnyei közé sorolható, hogy minimális mintaigényű (akár fmol) és könnyen alkalmazható eszköz [86].

II.6. Glikoziláció szerepe a biomarker kutatásban

A glikozilációs változások számos patológiás állapotban jól ismertek, például genetikai rendellenességek, gyulladásos betegségek és rákos betegségek esetén is igazoltak. Ezeknek a változásoknak a betegség specifikus biomarkerekként történő detektálása óriási lehetőségeket rejt magában. A glikán biomarkerek révén számos betegség korai stádiumban diagnosztizálhatóvá válhat, és elkerülhetővé válna az olyan bonyolult és fájdalmas diagnosztikai eljárás, mint például a biopszia. A glikánok analízisének gyakorlati jelentőségére jó példa Callewaert és munkatársainak munkája, ugyanis ők vizsgáltak először glikánokat a májcirrózis nem invazív diagnosztikai igazolására. Összehasonlították a glikán profilokat májcirrózisos és cirrózisban nem szenvedő páciensek klinikai vizsgálati adataival és egyértelműen el tudták különíteni a cirrózisban szenvedő betegeket a többi páciensztől [87].

Jelenleg klinikai biomarkerként csak a transferrin és az alpha-fetoprotein fehérjék glikozilációs módosulatait alkalmazzák. A transferrin egy májban képződő glikoprotein, melynek fő funkciója a vas transzportja. Számos malignus folyamat során, mint a petefészekrák, mellrák, vagy vastagbélrák, növekedett a transferrin glikán stuktúrák elágazásainak száma, illetve a fukoziláltság mértéke. Egy másik nagyon érdekes módosulás a transferrin glikozilációjának hiánya idült alkoholizmus esetén. Ennek oka, hogy transferrin glikozilálásáért felelős glikán transferázokat gátolja az acetaldehid, ami csökkenti a glikozilált transferrin képződését és nő a szénhidrát hiányos transferrin szintje. Ennek a jelenségnek köszönhetően a szénhidrát-hiányos transferrin jó biomarkere a hosszú távú alkoholfüggőség megállapításának [88-90].

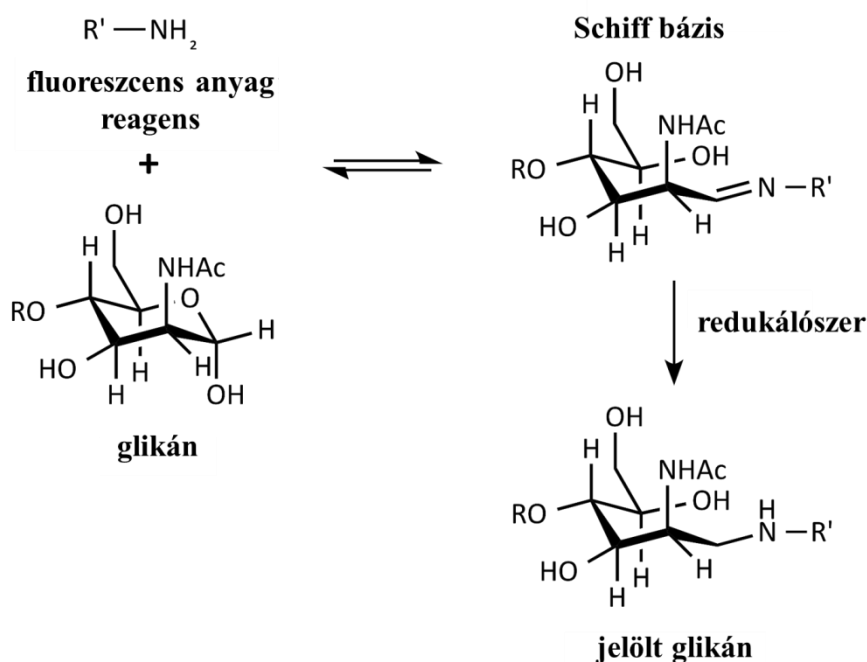
Az alpha-fetoprotein (AFP) egy olyan glikoprotein, amit normál esetben a máj termel a magzati fejlődés és a hepatociták regenerálása során. Megfigyelték, hogy a core α 1-6 fukozilált szérum alpha-fetoprotein szint megemelkedik máj karcinóma esetén és alkalmas biomarker a betegség korai felismerésére [91]. Továbbá, a páciensek szérumából 90%-os valószínűséggel előre jelezhető a máj karcinóma kialakulása [92]. Az AFP fokozott fukoziláltsága lektin affinitás alapú eljárással egyszerűen igazolható, mivel a *Lens culinaris* lektin kiemelkedő affinitást mutat a fukozilált glikán tartalmú fehérjék iránt.

Ahogy a transferrin [93] és az alpha-fetoprotein [94] esetében igazolt, a glikánok kiváló biomarkerek lehetnek. Megfelelő klinikai vizsgálatok elvégzése után, a myeloma multiplex betegek esetén is jól alkalmazható gyors eljárás lenne egy szénhidrát analízis alapú diagnosztikai eljárás, ugyanis a betegtől a vérvétel során gyűjtött vér kis mennyisége is elegendő a teljes glikán analízis elvégzéséhez. Ezek az eljárások azonban nagyon lassan integrálódnak a klinikai gyakorlatba, aminek több oka is van. Az egyik legjelentősebb probléma, hogy a cukor struktúrák azonosítására használt műszerek használata és karbantartása bonyolult, szakképzett személyzetet igényel, továbbá időigényes folyamatokról van szó. A modern kapilláris elektroforézis eszközök könnyen használhatók, azonban a klinikumba történő integrálódásukhoz indokolt néhány további fejlesztés elvégzése, mint például a gyorsabb elválasztási idő biztosítása, és a nagy betegszámra való tekintettel a multikapilláris rendszerek bevezetése. A nagy mintaszám ezen felül maga után vonná egy kevésbé toxikus jelölési eljárás szükségességét. A következőkben ezen problémák megoldásához szükséges elméleti alapokra szeretnék kitérni.

II.7. Hagyományos APTS jelölés és hátrányai

A terápiás fehérjék glikozilációjának ismerete és a betegségekben jelen lévő glikobiomarkerek kutatása gyors és érzékeny, nagy áteresztőképességű glikoanalitikai módszereket igényel [95, 96]. A felszabadított és derivatizált oligoszacharidok elemzésére tömegspektrometriás és NMR alapú strukturális vizsgálati technikák alkalmazása mellett főként folyadékfázisú bioanalitikai módszereket (folyadékkromatográfia - LC és kapilláris elektroforézis - CE) alkalmaznak [97, 98]. A komplex szénhidrátok jellemzése folyadék fázisú elválasztási rendszerekben optikai detektorral kromofór/fluorofór jelölés hiányában meglehetősen nehézkes, mivel a szénhidrátok nem rendelkeznek sem fényabszorpciós sem fluoreszcens csoportokkal [99]. Kapilláris elektroforézis elválasztás esetén a 8-amino-pirén-1,3,6-triszulfonát (APTS) az egyik leggyakrabban alkalmazott redukzív aminációs alapú derivatizáló molekula, amely az elektromigráció szempontjából kulcsfontosságú három negatív töltéssel és magas fluoreszcens határfokkal rendelkezik, ezért kiemelkedően alkalmas CE-LIF módszer esetén [100, 101]. Az APTS jelölt glikánok lézer indukált fluoreszcenciájának (LIF) kimutatási határértéke a rendkívül alacsony femtomoláris tartományban van [102]. A redukzív aminációs reakciók legszélesebb körben alkalmazott redukálószer a nátrium-ciano-borohidrid [103]. Ezen redukzív aminációs szer nagyon

magas kihozattal biztosít az oligoszacharidok jelölése során. A 8. ábrán látható derivatizációs reakció első lépésében a szénhidrát nyitott gyűrűs formája reverzibilis reakció keretében reagál az APTS primer amin csoportjával és egy vízmolekula kilépésével Schiff-bázis képződik. A reakció második, irreverzibilis lépésében a Schiff-bázist stabil egységgé redukáljuk.

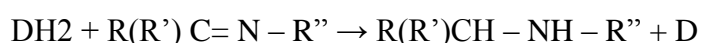


8. ábra: Reduktív amináláson alapuló cukor jelölési reakció fluoreszcens ágenssel (R: a cukor molekula többi része; R': fluorofór festék).

Mivel a reakció során felhasznált nátrium-cianoborohidridből hidrogén-cianid (HCN) szabadul fel, javasolt az alternatív redukálószer alkalmazása, mint például nátrium-triacetoxi-borohidrid (NaBH(OAc)₃) [104, 105], borán-dietil-amin és 2-pikolin-borán [103]. A gyógyszeripar részéről egyre jelentősebb igény mutatkozik a glikánok vizsgálatára, így a fent említett HCN probléma jelentősége is növekszik.

II.8. Irídium- és ruténium-foszfín komplexel való redukív aminálás elméleti alapjai

A H_2 gázzal, vagy oldható hidridekkel (pl. $NaBH_4$, $NaBH_3CN$, stb.) történő hidrogénezést összehasonlítva a telítetlen szubsztrátok (alkének, karbonilok, iminek, etc.) transzfer hidrogénezésével, ez utóbbi módszer figyelemre méltó előnyöket hordoz magában. Ezekben a reakciókban ugyanis a hidrogén közvetlenül átvihető egy donor molekuláról (D) a szubsztrát telítetlen helyére:



Ahol D: donor molekula. R és R': aril, alkil. Szintézis céljára használt legjelentősebb hidrogén donorok közé tartozik a 2-propanol, a formiátok és a hangyasav (gyakran a két utóbbi keveréke). Számos homogén vagy heterogén katalizátort alkalmazhatunk ezekben a reakciókban, de a nemesfémek foszfín komplexei a legaktívabbak [106]. Ha hidrogén donorként hangyasavat használunk, figyelembe kell venni a $HCOOH$ katalitikus bomlását is, amikor H_2 és CO_2 keletkezik. Fontos megjegyezni, hogy a komplex katalizálja a hidrogénezést gáz halmazállapotú H_2 -al is [107], bár ez, mint mellékreakció nem gátolja a telítetlen szubsztrát redukcióját, ugyanakkor nagyobb mennyiségű $HCOOH$ -t igényel gázfázisban. A Ru (II) - és Ir (III) - komplexek használatát elősegíti a jó vízdoldhatóságuk [108]. A hangyasav és a meta-monoszulfonált-trifenilfoszfín nátrium sója (mtpms) nem mérgezőek és a katalizátorok vizes oldatainak használata nem rejt magában semmilyen egészségügyi kockázatot.

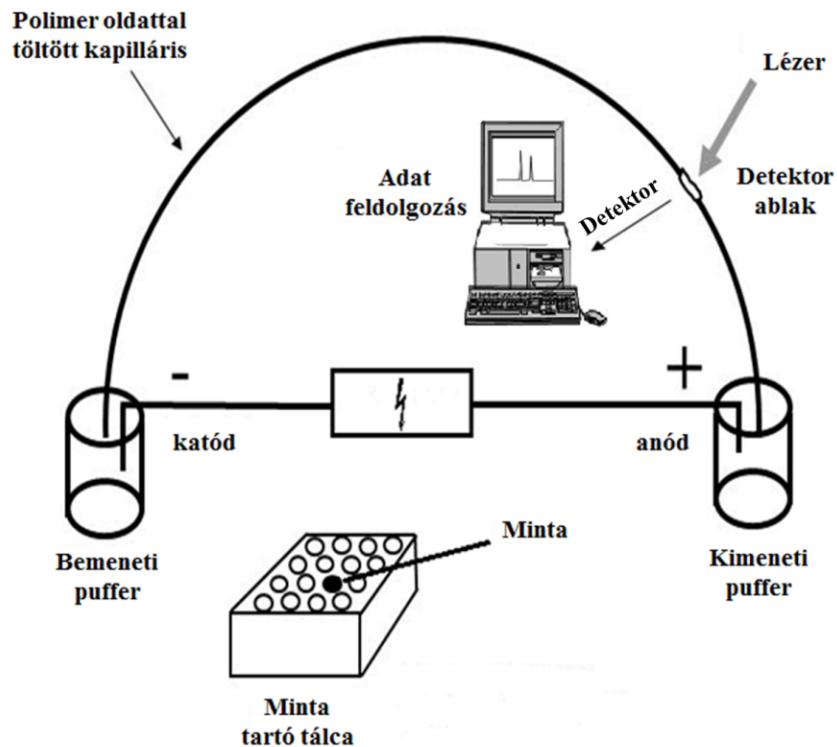
II.9. Kapilláris gél elektroforézis

Egy tipikus kapilláris gél elektroforézis (CGE) készülék az elválasztó kapillárisból, egy nagyfeszültségű tápegységből, megfelelő detektáló egységből és adatgyűjtő eszközből áll, amint az a 9. ábrán látható. CGE rendszerben a kapilláris effektív hossza általában 10-100 cm között változhat, míg belső és külső átmérőjük 20-100 μm i.d. és 150-360 μm o.d. közötti tartományban mozog [109]. Egy-, vagy többkapillárisos rendszerek léteznek, ahol a szilika kapilláris belső falát az elválasztási feladatnak megfelelően többféleképpen

módosíthatjuk (kovalensen vagy dinamikusan), hogy megváltoztassuk vagy teljesen elimináljuk az elektroosmotikus áramlást (EOF), valamint megakadályozzuk a mintakomponensek esetleges adszorpcióját [109, 110].

A CGE eszközökbe a mintabevitel elektrokinetikus vagy nyomással való injektálós módszerrel történhet [111]. Az elektrokinetikus injektálási megoldás az egyetlen lehetőség amennyiben az elválasztó gél puffer magas viszkozitású. Elektrokinetikus injektálás során a töltött minta molekulák elektromos térerősség hatására a kapillárisba kényszerülnek, míg nyomásinjektálás esetén az ideiglenesen nyomás alá helyezett mintatartóból a minta oldat a kapillárisba áramlik (az alacsonyabb nyomás felé). A só-mentes vizes oldatokból történő elektrokinetikus mintainjektálás nagy mennyiségű minta bejutását eredményezi, mivel a puffer ko-ionok nem versenyeznek a mintamolekulákkal, így kiemelkedően jó detektálási érzékenység érhető el (LOD) [112]. Fontos továbbá a reprodukálható eredmények érdekében, hogy a kapilláris hőmérséklete az elválasztás során megfelelő pontossággal legyen szabályozva [113].

Az elválasztás során a minta molekulák a kapillárisban lévő szeparáló pufferben elektromos térerő hatására töltésüknek megfelelően vándorolnak, és ennek megfelelően kell a detektálás helyét meghatározni (normál vagy fordított polaritás). A legtöbb modern kapilláris elektroforézis készülék 30 kV elválasztási feszültség alkalmazását is lehetővé teszi, valamint 15-65 °C hőmérséklet tartományban működtethető. A detektálás megoldható optikai módon UV/UV-Vis rendszerekkel, pásztázó dióda array, LIF, vagy olyan speciális módszerekkel, mint az elektrokémiai, vezetőképességi, vagy tömegspektrometriás detektálás [114]. Ez utóbbi esetben elektro spray módszer alkalmazásánál általában az elválasztó kapilláris vége a sprayer hegye [115].



9. ábra: A CGE-LIF rendszer fordított polaritású működési módjának vázlatos bemutatása.

II.9.1. Elektroforetikus mobilitás

Az elektroforetikus elválasztási módszerek azon az elven működnek, hogy az oldott anyagok elektromos térben töltés/hidrodinamikai térfogatuknak megfelelően különböző sebességgel vándorolnak [116]. A töltéssel rendelkező részecskék elektromos térerősség hatására történő vándorlását Newton második törvénye írja le:

$$m \left(\frac{d^2 x}{dt^2} \right) = EQ - f \left(\frac{dx}{dt} \right) \quad (eq 2)$$

ahol, m a tömeg és d^2x/dt^2 a gyorsulás. A súrlódási erő (F_f) az ellenkező irányba hat, ahol f a translációs súrlódási együttható, dx és dt a távolság és idő komponensek:

$$F_f = f \left(\frac{dx}{dt} \right) \quad (eq 3)$$

Egyensúly esetén a minta molekulák állandó sebességgel (v) vándorolnak:

$$v = \frac{dx}{dt} = E \cdot \frac{Q}{f} \quad (eq\ 4)$$

A translációs súrlódási együttható (f) arányos a háttér elektrolit viszkozitásával (η), amit a következő egyenlettel írhatunk le [117]:

$$f = c \cdot \eta \quad (eq\ 5)$$

ahol c konstans értékét a molekulák alakja befolyásolja (gömb alakú részecskék esetén $c = 6\pi r$, ahol r a molekula sugara) [118].

Az elektroforetikus mobilitás (μ) úgy definiálható, mint a térerősségre normalizált vándorlási sebesség, v/E , és a következőképpen fejezhető ki a fenti egyenletek összevonásával:

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{Q}{c \cdot \eta} \quad (eq\ 6)$$

Az Eyring-Polanyi egyenlet [119] szerint a háttér elektrolit viszkozitását a következő egyenlet írja le:

$$\eta = A \cdot e^{E_a/RT} \quad (eq\ 7)$$

Ebben az egyenletben A a pre-exponenciális faktor, E_a a mintakomponens elektromigrációjához szükséges aktivációs energia, R az univerzális gáz állandó és T az abszolút hőmérséklet. Fontos megjegyezni, hogy az elektroforetikus mobilitási értékeket korrigálni kell az oldat hőmérséklet-függő viszkozitás változásával (1,1%/°C) [120]. Az elektroforetikus mobilitást (μ) a fentiek alapján az alábbi egyenlettel fejezhetjük ki ($const$ a c és A elemek összevonását jelöli):

$$\mu = \frac{Q}{const} \cdot e^{-E_a/RT} \quad (eq\ 8)$$

A gyakorlatban az E_a értékeket az Arrhenius-diagramok [121] meredekségéből határozzuk meg úgy, hogy az elektroforetikus mobilitás logaritmusát az abszolút hőmérséklet reciprokanak függvényében ábrázoljuk:

$$\ln \mu = \ln \frac{Q}{const} - \frac{E_a}{RT} \quad (eq\ 9)$$

CGE-ben az elválasztás hatásosságára jellemző elméleti tényérszámot (N) a 10-es egyenlet írja le, ahol μ az elválasztandó mintakomponens elektroforetikus mobilitása, l a kapilláris effektív hossza az injektálástól a detektálási pontig, D pedig a vándorló mintakomponens diffúziós együtthatója.

$$N = \mu \frac{E \cdot l}{2D} \quad (eq\ 10)$$

Az elválasztás felbontását (R_s) [122] két mintakomponens elektroforetikus mobilitása közötti mobilitás ($\Delta\mu$) különbségből számítva a következő egyenlettel jellemezhetjük:

$$R_s = 0.18 \cdot \Delta\mu \sqrt{\frac{E \cdot l}{D \cdot \mu m}} \quad (eq\ 11)$$

Az 10 és 11-es egyenletek alapján a nagyobb elválasztási hatékonyság (N) és ennek megfelelően a nagyobb felbontás (R_s) az alacsonyabb diffúziós együttható és a magasabb alkalmazott elektromos térerősség eredménye. A 12-es egyenlet szerint a magas felbontóképesség elérésének korlátozó tényezője elsősorban a kapcsolófeszültség hatására fejlődő ún. Joule-hő (Q_j), ahol r = az oszlop belső sugara, L = a kapilláris teljes hossza, és I = az áram:

$$Q_j = \frac{P}{r^2 \cdot I \cdot l} \quad (eq\ 12)$$

A migrációs idő reprodukálhatósága és a Joule-hő korlátozásával összefüggő CGE problémákra fontos megoldás a korszerű kapilláris elektroforézis rendszerekben lévő hőmérséklet-szabályozó termosztát (folyadék, vagy léghűtés) alkalmazása az elválasztás során [123].

II.9.2. Kapilláris elektroforézis mintainjektálási eljárások

A gyors és nagyszámú mintaelemzés bevezetése minden „omics” területen, így a modern biofarmakológiai kutatások bioanalitikai szegmensében is jelentős előrelépést hozott. Ez a fejlődés új lehetőségeket biztosított olyan módszerek kidolgozásához, amelyek a gyógyszeripari fejlesztések alapjául szolgáltak és lehetővé tették a fehérje alapú gyógyszerkészítmények gyors és hatékony analízisét [124]. A jelenlegi gyógyszeripari kutatások egyik kiemelt területe a terápiás glikoproteinek

szénhidrátszerkezetének a funkcióval történő összefüggéseinek megértése és a glikomika fontosságának felmérése [125]. 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. Willams és mtsai. [126] 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 elektrokinetikusan injektálták egymás után még az elválasztás megkezdése előtt. Veuthey és mtsai. [127] kapilláris elektroforézist alkalmaztak alternatív módon ismételt injektálásra kismolekulás gyógyszeripari termékek esetében úgy, hogy a mintákat és elektrolit zónákat az elválasztás megkezdése előtt juttatták a kapillárisba. Az optimalizált elektrolit zónák (2 × hosszabb, mint a minta zóna) jobb felbontást biztosítottak. Egy másik típusú többszörös mintainjektálás esetén csökkentették az egy mintára eső elválasztási időt, és sikeresen alkalmazták a módszert UV és MS detektálás során [128]. Staub és mtsai. [129] CE-UV-ESI-TOF/MS eljárást alkalmaztak inzulin gyors azonosítására és mennyiségi meghatározására. Ennek során négy mintát injektáltak háttér elektrolittal és belső standarddal együtt. Egy másik megközelítésben többszörös mintainjektálási eljárást dolgoztak ki kapilláris zónaelektroforézis rendszerben (MICZE: multiple-injection capillary zone electrophoresis) szalbutamol vizsgálatára [130]. Hét minta sorozatot injektáltak, amelyek mindegyike három azonos mintát tartalmazott és egyetlen futtatás alatt történt meg az elválasztás. Ez összesen huszonegy egymást követő injektálást jelentett (hat standard és tizenöt minta), amely szalbutamolt és oxprenolol markert is tartalmazott. Az injektált mintákat háttér elektrolit (BGE) dugók különítették el egymástól és részleges elektroforézissel fókuszálták, majd egy rutinszerű kapilláris zónaelektroforézis protokollal választották el az összes bevitt mintát. Egy másik érdekes megközelítés a kapilláris elektroforézis rendszerek áteresztő képességének növelésére az úgynevezett multiszegmens injektálási eljárás [131]. Ezzel a megközelítéssel a teljes kapillárist körülbelül egyharmadáig, ismétlődően minta és BGE zónákkal töltik fel mielőtt a tényleges CE elválasztást megkezdenék. Tehát, csak az összes elválasztani kívánt egység beinjektálása után indul meg a tényleges minta elválasztás. Ezekben a multiszegmentes injektálási eljárásokban eddig csak a nyomással történő injektálást alkalmazták és igazolták és MS-el

történő detektálás megvalósíthatóságát. Hudson és munkatársai CESI-MS módszert alkalmaztak 100 cm hosszú kapillárisal, de ez a módszer csak egyetlen mintakomponens optikai azonosítására volt alkalmas, igaz nagyszámú mintából [132].

III. CÉLKITŰZÉSEK

A myeloma multiplex betegek túlélési esélyeit és életminőségét jelentősen befolyásolja az állapotuk mielőbbi felismerése. A betegek jelentős többsége IgG eredetű paraprotein termelő. Ennek ismeretében az volt a célom, hogy az immunoglobulin G paraproteint (IgG) termelő myeloma multiplexben szenvedő betegek teljes 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 pontosabb és gyorsabb diagnózisának felállításában.

Mivel ez a minta előkészítési eljárás jól robotizálható, lehetőség lenne nagy mennyiségű minta egyidejű és gyors analizisére. Ennek megfelelően munkám másik fő célkitűzése volt, hogy a jelenleg rutinszerűen alkalmazott jelölési eljárásnál környezetkímélőbb és biztonságosabb szénhidrát jelölési módszert dolgozzak ki. Napjainkban széleskörűen elterjedt redukív aminálásos derivatizálási módszer nátrium-cianoborohidridet alkalmaz a cukor-fluorofór Schiff-bázis redukálással történő stabilizálására, mely környezet és egészségkárosító hatású HCN-ot termel. Irodalmi adatokból kiindulva, azt feltételeztem, hogy a $\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2$ és $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3]$ vegyületek alkalmasak lehetnek glikán jelölés során a redukív aminálási folyamatban kialakuló imin-intermedierek hidrogénezésére (redukciós lépés). A fő N-glikán típusokat jól reprezentáló nagyrészben neutrális humán IgG, a szialilált fetuin és mannozilált szarvasmarha ribonukleáz B aszparagin kötött cukrai alkalmas standardként szolgáltak a módszerfejlesztési vizsgálataim során.

Továbbá célul tűztem ki egy újfajta minta injektálási metodika fejlesztését, melyben rövidebb elválasztási idő mellett is megtartható az információ gazdag minta analizis, azaz jelentősen növelhető az időegység alatt mért minták száma.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV.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 szérumszámokat.

IV.2. Humán szérumszámok és standard glikoprotein minták

A vizsgálatba 7 kezeletlen, 7 kezelés alatt álló és 7 remissziós myeloma multiplex-es pácienszt vontunk be, illetve 7 egészséges, azonos korcsoportban lévő nőtől és férfitől gyűjtöttünk kontroll szérumszámot kicsapódást gátló szérumszámokba (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, USA). Jelen vizsgálatból kizártuk a fertőző betegségben, vagy krónikus gyulladásos betegségben, illetve egyéb más tumoros elváltozásban szenvedő betegeket, továbbá a kábítószer-függő pácienseket. A levett vérszámokat azonnal centrifugáltuk 30 percen keresztül 7500 x g-vel, majd a szérumszámot további felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

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

IV.3. Vegyszerek

A Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 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, USA). A PNGase F enzimet a ProZyme (Hayward, CA, USA), 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, USA) cégtől vettük. A NEB Denaturáló puffer-t és az 1x-Glyco puffer 2-t a New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) cégtől szereztük be. Az Agencourt CleanSEQ mágneses gyöngyöket a Beckman Coulter (Indianapolis, IN, USA) cégtől vásároltuk.

IV.4. Módszerek

A myeloma multiplex minták analizéséhez kontroll szérumból történő IgG N-glikoziláció vizsgálatára, mellett kidolgoztam egy módszert a szérumból történő IgG N-glikoziláció vizsgálatára, továbbá egy másik eljárást totál szérumból történő N-glikán analizésre.

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 [98].

IV.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 μ L-t adtam 100 μ L szérum mintához, majd a keveréket 37 °C-on 4 h keresztül inkubáltam. A reakciót 20 μ L jodoacetamid hozzáadásával (0,3 M 1 x PBS-ben oldva) állítottam le.

IV.4.2. IgG Fc fragmentjének tisztítása

220 μ L papain emésztett szérum oldatot használtam minden minta típus esetén (egészséges kontroll, kezeletlen, kezelt és remisszióban lévő MM betegek) a 20 μ L térfogatú Protein A affinitás töltetű pipetta hegyekhez (Phynexus, San Jose, CA, USA). 200 μ L 1 x kötő puffert (0,7 M NaH_2PO_4 , 0,7 M NaCl, pH 7,4) adtam minden szérum mintához, majd 200 μ L 0,7 M NaH_2PO_4 0,7 M NaCl oldattal (pH 7,4) mostam a Protein A tölteteket és a mintákat átengedtem a mikro-oszloptölteteken. Ezután 200 μ L 140 mM NaCl oldattal mostam a mikro-oszlopokat és végül 200 μ L of 15% ecetsav oldattal (pH 2,0) eluáltam a felkötődött Fc fragmentumokat. Minden eluált mintát 10 kDa szűrőt tartalmazó eppendorf csőbe vittem át és centrifugáltam 10 percig 11270 x g-vel, majd 100 μ L 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.

IV.4.3. IgG κ/λ könnyűláncok tisztítása

A fentebb leírt papain emésztéses keverékből 100 μ L-t adtam minden 100 μ L mintához (egészséges kontroll, kezeletlen, kezelt és remisszióban lévő MM betegek), majd 4 óras 37 °C-on történő inkubáció után 20 μ L 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 μ L töltet térfogat, PhyNexus, San Jose, CA, USA). 200 μ L 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 NaH_2PO_4 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.

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

10 kDa szűrőt tartalmazó eppendorf csőben (VWR, Radnor, PA, USA) 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, USA) beszáritottam a fluorofór 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 beszáritott N-glikán mintákhoz majd 37 °C-on 16 órán keresztül inkubáltam. A jelölt mintákat CleanSeq mágneses gyöngyök (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) segítségével tisztítottam meg a feleslegesben adott fluorofór festékanyagtól egy korábban

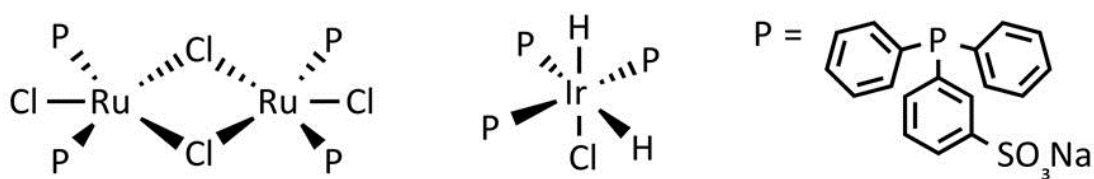
már publikált, a Horváth Laboratóriumban kidolgozott eljárás segítségével [98]. A jelölés után tisztított minták azonnal alkalmasak voltak CE-LIF rendszerben történő analízisre. Amennyiben nem analizáltam őket azonnal $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tárolva hosszú időn keresztül stabilak maradtak.

IV.4.5. Standard glikoprotein minta előkészítés

A 10 mg/ml -es koncentrációjú fetuin, RNáz B és IgG minták $10\text{ }\mu\text{L}$ -éhez $1\text{ }\mu\text{L}$ denaturáló puffert (400 mM DTT , $5\% \text{ SDS}$) adtam, majd $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 10 percen keresztül inkubáltam. Ezután $2,5\text{ }\mu\text{L G7}$ puffert, $2,5\text{ }\mu\text{L }1\%$ -os NP-40 oldat és $1\text{ }\mu\text{L PNGase F}$ enzimet adtam a mintákhoz és $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 percig emésztettem. A felszabadított N-glikán struktúrákat fluoreszcens APTS festékkel jelöltem, majd mágneses gyöngyök alkalmazása mellett egy korábban már publikált [133] automatikus glikán tisztítást végeztem, hogy eltávolítsam a feleslegben adott festéket a mintákból.

IV.4.6. Az $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtppps})_3]$ cisz,mer-irídium-dihidrido-kloro-trisz(meta-monoszulfonált-trifenilfoszfín nátrium) (trisodium cis-mer-chloro-dihidrido-tris(diphenylphosphinobenzene-m-sulfonato) irídium(III)) és a $[\text{RuCl}_2(\text{mtppps})_2]$ ruténium-dikloro-bisz(meta-monoszulfonált-trifenilfoszfín nátrium)-dimer (disodium dichloro-bis(diphenylphosphinobenzene-m-sulfonato) ruthenium(II)) vegyületek előállítása

Az $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtppps})_3]$ (trisodium cis-mer-chloro-dihidrido-tris(diphenylphosphinobenzene-m-sulfonato) irídium(III)) és a $[\text{RuCl}_2(\text{mtppps})_2]$ (disodium dichloro-bis (diphenylphosphinobenzene-m-sulfonato) ruténium(II)) (10. ábra) házilag szintetizált komplexeket (Fizikai Kémiai Tanszék, Debreceni Egyetem, Debrecen) kaptam a kísérletekhez [4, 134]. Említésre méltó a Ru(II)-komplexnek stabil dimer szerkezete (10. ábra, habár itt az egyszerűség kedvéért monomer formában ábrázoltam). Mindkét komplex nagyon jól oldódik vízben és egyszerűen előállítható az $\text{IrCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ [4] és a $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ [134] halogenid prekursorokból monoszulfonált trifenil-foszfínnel (mtppps) [134] reagáltatva.



10. ábra: A redukív aminálási reakcióban használt vízoldható ruténium $[\text{RuCl}_2(\text{mtppps})_2]$ és irídium $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtppps})_3]$ komplexek.

IV.4.7. Irídium- és ruténium-foszfin 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 [98], majd 55 $^\circ\text{C}$ -on, 60 percig inkubáltam a reakciókeveréket. 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 vízoldható irídium(III) dihidrid komplexet (5 mg/mL) vagy 1,5 μL vízoldható ruténium komplexet (5 mg/mL) adtam a beszárított glikán mintákhoz. A reakció keveréket 55 $^\circ\text{C}$ -on inkubáltam 10, 20, 40 és 60 percen keresztül. A jelölt mintákat CleanSeq mágneses gyöngyök (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) segítségével tisztítottam meg a feleslegben adott festékanyagtól a kutatócsoportunk által korábban publikált eljárás [98] alkalmazásával. A tisztított minták azonnal alkalmasak voltak a CE-LIF mérésre, de későbbi mérésekhez $-20\text{ }^\circ\text{C}$ tárolva legalább egy évig eltarthatók voltak.

IV.4.8. Kapilláris elektroforézis

A kapilláris elektroforézis méréshez lézer indukált fluoreszcens (LIF) detektorral felszerelt készüléket (P/ACE MDQ, SCIEX, Brea, CA, USA) 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 kapillárist (SCIEX, Brea, CA, USA) 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, USA).

A mintákat 1 psi (6894 Pa) nyomással injektáltam 5 másodpercig. Az elválasztások során fordított polaritású üzemmódban 30 kV elektromos potenciál alkalmazása mellett 25 °C, 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.

IV.4.9. Statisztikai analízis

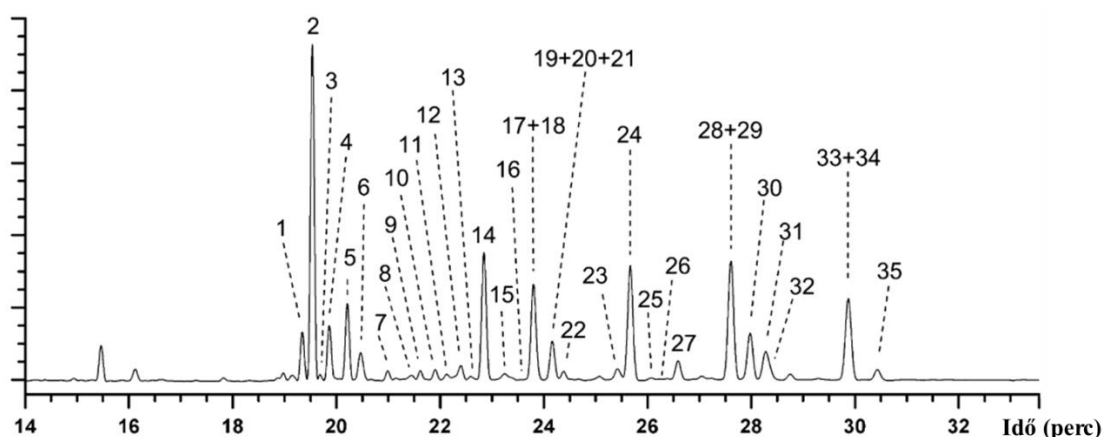
A statisztikai számítások során főkomponens analízist (PCA) [135] és egyváltozós variancia analízist (ANOVA) [136] alkalmaztam, továbbá meghatároztam a standard hibát az SPSS 22 (IBM Corp.) program alkalmazásával a %-os csúcsterületek alapján, amiket a 32 Karat software (SCIEX, Brea, CA, USA) használatával határoztam meg. A vizsgálati csoportok közötti csúcsintenzitások összehasonlítására Tukey *post hoc* tesztet alkalmaztam [137]. A különbségeket akkor tekintettem szignifikánsnak, ha a p érték 0,05, vagy annál kisebb volt.

V. EREDMÉNYEK

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

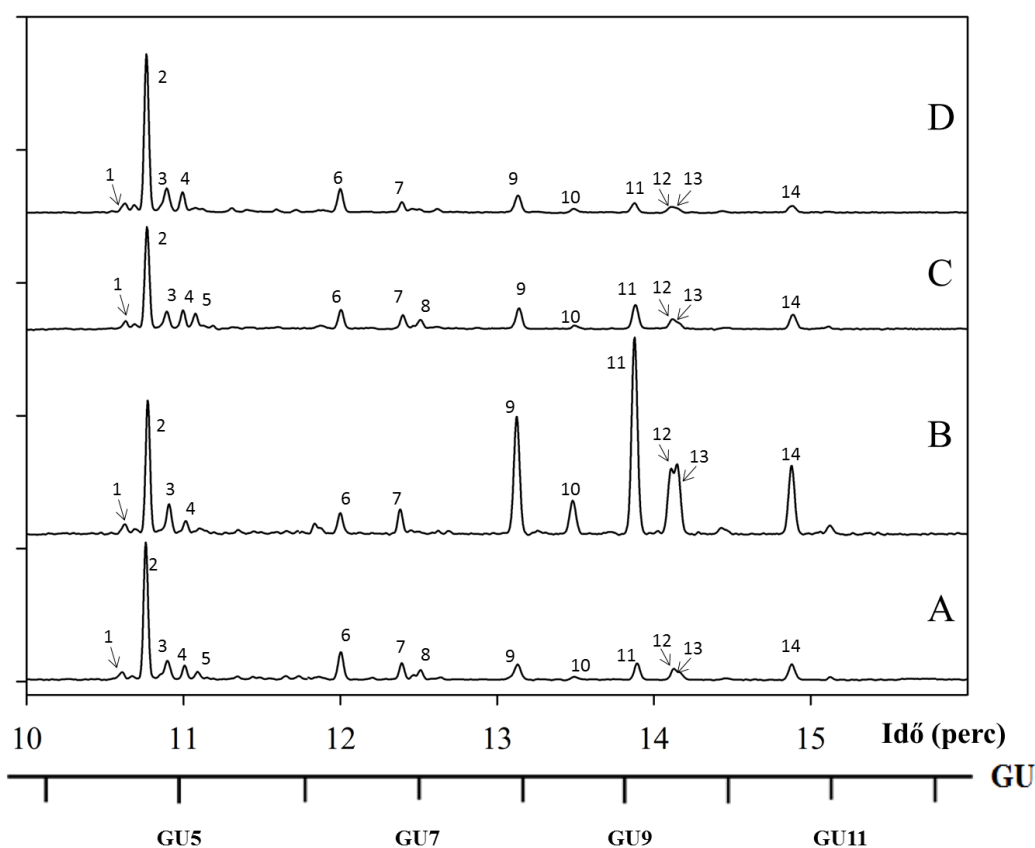
A munka kezdeteként egészséges kontroll személyek szérum mintáinak N-glikán profilját vizsgáltam. Minden mintából két párhuzamos vizsgálatot végeztem egyidejűleg és összesen öt alkalommal mértem le a begyűjtött mintákat. Ruhak és mtsai. 2010-ben publikált teljes szérum elektroferogramját [138] reprezentatív céllal tüntetem fel a 11. ábrán. Ezen az ábrán a kutatócsoport összesen 35 struktúrát tudott azonosítani. Részben ez a publikáció alapozta meg a teljes szérum vizsgálataim során talált csúcsok azonosítását, ahol 14 olyan csúcsot azonosítottam, amelyeknek a csúcsterülete $\geq 1\%$ volt (1. táblázat). Ezek között egyaránt előfordultak kettő vagy több szialsavat (1-4), illetve egy szialsavat tartalmazó (5-8), valamint neutrális (9-14) glikán struktúrák.

A GU értékek glikán-specifikusak, melyeket adatbázisokban gyűjtenek, illetve standard fehérjék esetén könyvtárak formájában tárolnak. A szénhidrátok azonosítását GU értékük alapján határoztam meg, amelyhez a szükséges kalibrációs görbét standard maltooligoszacharid létra analízisével állítottam fel, továbbá a Járvas és mtsai. [63] által kidolgozott programot (www.GUcal.hu), a NIBRT adatbázist (<https://glycobase.nibrt.ie>) és korábban publikált irodalmi adatokat [138] használtam fel. Nem egyértelmű esetekben exoglikozidáz alapú szénhidrát szekvenálást alkalmaztam. A kiértékelés során kapott struktúrákat az 1. táblázatban mutatom be, továbbá itt tüntetem fel az egészséges kontroll, a frissen diagnosztizált, a kezelt és remisszióban lévő MM betegek szérum mintái N-glikánjainak százalékos eloszlását.



11. ábra: Teljes szérum referencia N-glikán profiljának kapillaris elektroforetikus (CE) analízise Ruhak és mtsai. publikációjából [138].

Az általam vizsgált kontroll mintából meghatározott totál szérum N-glikán profilt összevettem előre megszabott kritériumok alapján a három MM beteg csoport (frissen diagnosztizált, kezelt és remisszió) totál szérum N-glikán mintáival. Ahogy a 12. ábrán látható, a kezeletlen (**B** elektroferogram), a kezelés alatt álló (**C** elektroferogram) és a remisszióban lévő (**D** elektroferogram) MM betegcsoportok jelentős csúcs profilbeli eltéréseket mutattak a kontroll csoporttal összehasonlítva. A frissen diagnosztizált kezeletlen betegcsoportban (**B**) szignifikánsan különbözött a sziálsavas és neutrális N-glikán struktúrák aránya a kontroll csoporthoz képest. A sziálsavas 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 sziálsavas és neutrális N-glikán struktúrákaránya, ami igen jelentős különbség.



12. ábra: Egészséges kontroll (**A**), frissen diagnosztizált (**B**), kezelés alatt álló (**C**) és remisszióban lévő (**D**) MM betegek APTS-el jelölt totál szérum N-glikán profiljának kapilláris elektroforetikus (CE-LIF) analízise. Elválasztási körülmények: NCHO kapilláris 50 cm effektív hossz (teljes hossz 60 cm, 50 μ m ID); NCHO szeparáló puffer; Elválasztási hőmérséklet: 25 °C; Alkalmazott feszültség: 30 kV (0,17 perc ramp) fordított polaritás; Injektálás: 1,0 psi, 5 sec.

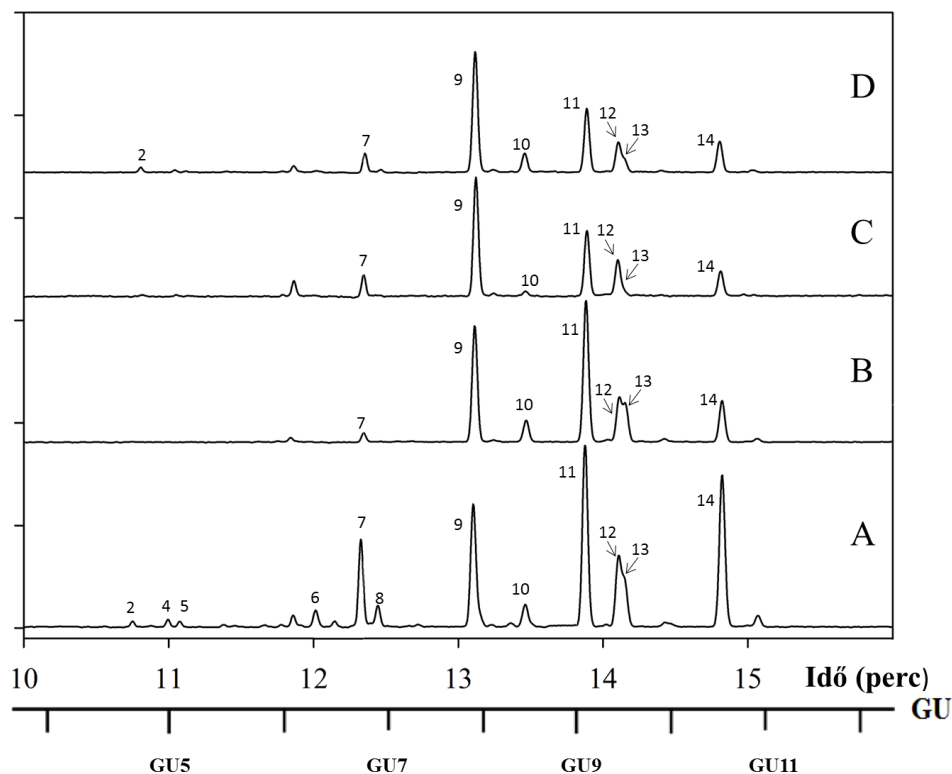
1. táblázat: A vizsgálat során meghatározott N-glikánok GU értéke, szerkezete és %-os eloszlása. A csúcsok számozása csúcsok számozása a 12 - 14. ábráknak megfelelően van feltüntetve.

Csúcs száma	Teljes szérum glikán	GU _{CE} -egység	Glikán struktúra	Kontroll Terület %	Kezeletlen Terület %	Kezelt Terület %	Remisszió Terület %
1	A3G(4)3S(6,6)3	4,50		2,65	1	2,78	3,84
2	A2G(4)2S(6,6)2	4,57		38,23	20,72	16,38	45,16
3	A2G(4)2S(3,3)2	4,76		7,83	2,3	1,79	10,36
4	F(6)A2[6]G(4)2S(6,6)2	5,83		4,17	1,04	1,38	7,17
5	F(6)A2BG(4)2S(6,6)2	5,89		2,64	-	0,81	1,39
6	A2[6]G(4)2S(6)1	6,65		9,51	1,4	5,14	8,61
7	F(6)A2G(4)2S(3)1	7,07		5,4	1,7	5,85	5,93
8	F(6)A2BG(4)2S(3)1	7,12		4,31	-	1,96	-
9	F(6)A2	7,67		6,71	7,08	13,93	1,01
10	F(6)A2B	8,13		-	6,11	-	-
11	F(6)A2[6]G(4)1	8,67		6,08	29,65	9,93	7,59
12	F(6)A2[3]G(4)1	9,00		5,91	6,79	14,22	1,93
13	F(6)A2[6]BG(4)1	9,09		4,25	3,08	22,68	3,93
14	F(6)A2G(4)2	10,17		2,24	19,13	3,16	3,08
15	F(6)A2[6]BG(4)1S(6)1	6,01		-	21,78	-	-
16	A2BG(4)2S(6)1	6,41		-	17,05	-	-

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

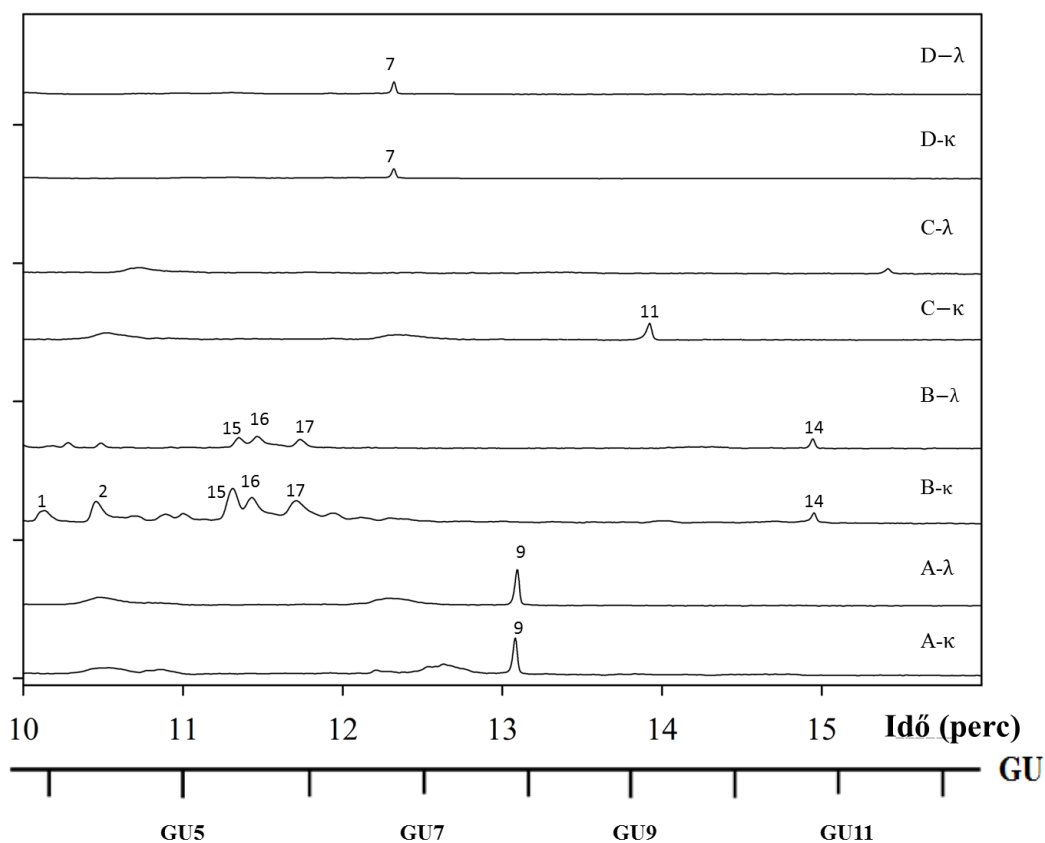
A kísérletek következő szakaszában papinnal emésztett totál szérumból IgG Fc frakcionálást végeztem Protein A, valamint IgG Fab κ/λ könnyűlánc frakcionálást IgG Fab κ/λ könnyűlánc specifikus affinitás alapú mikro-oszlopokkal. Minden mintából két párhuzamost vizsgáltam egyidejűleg és összesen öt alkalommal mértem le a begyűjtött mintákat. A 13. ábra a négy vizsgálati csoport Fc frakcióinak N-glikán emésztését követő CE-LIF eredményeit mutatja be. A 14. ábra az Fab κ/λ könnyűláncok N-glikán profiljait ábrázolja.

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) [80, 139]. Érdekes módon, amint ezt a 13. ábra is reprezentálja, 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 klón által termelt IgG frakciót érinti. A sziálsavas 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 sziálsavas és neutrális N-glikán forma arányok a következőképpen alakultak: a kontroll csoportban (**A** elektroferogram) az IgG Fc sziálsavas és neutrális N-glikán struktúrák aránya 0,22 (18,26%/81,74%), míg a kezeletlen betegeknél (**B** elektroferogram) a sziálsavas és neutrális N-glikán formák aránya 0,08 (7,49%/92,51%), a kezelt betegek esetén (**C** elektroferogram) pedig 0,11 (10,19%/89,81%), míg a remisszióban lévő pácienseknél (**D** elektroferogram) ugyanezen struktúrák aránya 0,14 (12,55%/87,45) volt.



13. ábra: Egészséges kontroll (A), frissen diagnosztizált (B), kezelés alatt álló (C) és remisszióban lévő (D) MM betegek IgG Fc frakciójának N-glikán profilja. Az elválasztási körülmények azonosak voltak az 12. ábrán leírtakkal.

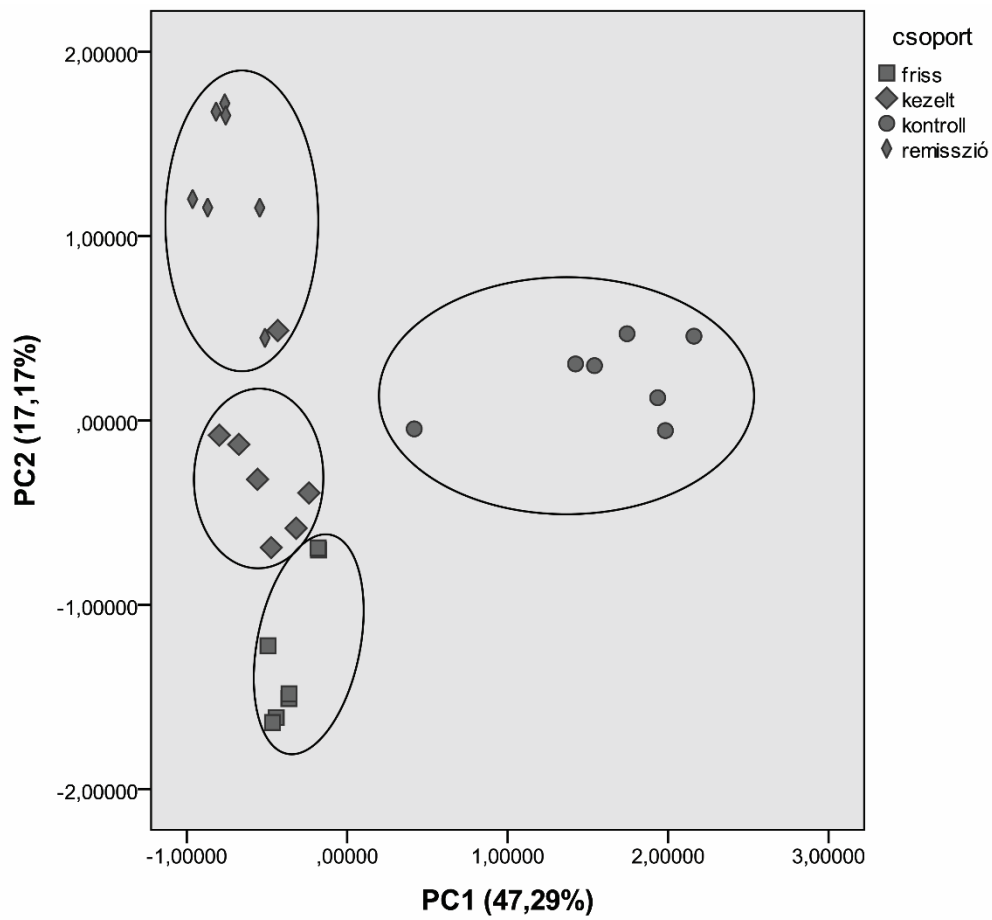
A 14. ábra a Fab kapa (κ) és lambda (λ) könnyűláncok PNGase F emésztés utáni APTS jelölt N-glikán profiljait mutatja be. Az IgG Fab kontroll csoport (A elektroferogrammmok) esetén nem találtam sziálsavas struktúrákat, amiből következőleg a neutrális N-glikán formák aránya 100%. A frissen diagnosztizált betegek estén néhány sziálsavas glikán struktúrát sikerült azonosítanom (B elektroferogrammmok), így itt az IgG Fab sziálsavas és neutrális N-glikán struktúrák aránya 6,96 (87,44%/12,56%). A kezelés alatt álló (C elektroferogrammmok) és remisszióban lévő (D elektroferogrammmok) MM betegek kapa és lambda könnyűlánc fragmentumainak N-glikozilációs profiljában a kontroll csoporthoz hasonlóan nem detektáltam sziálsavas struktúrákat, ennek megfelelően az IgG Fab neutrális N-glikánok mennyisége itt is 100% volt.



14. ábra: Egészséges kontroll (A), frissen diagnosztizált (B), kezelés alatt álló (C) és remisszióban lévő (D) MM betegek IgG Fab frakciójának APTS jelölt N-glikán profilja. Az elválasztás körülményei megegyeztek az 12. ábrán leírtakkal.

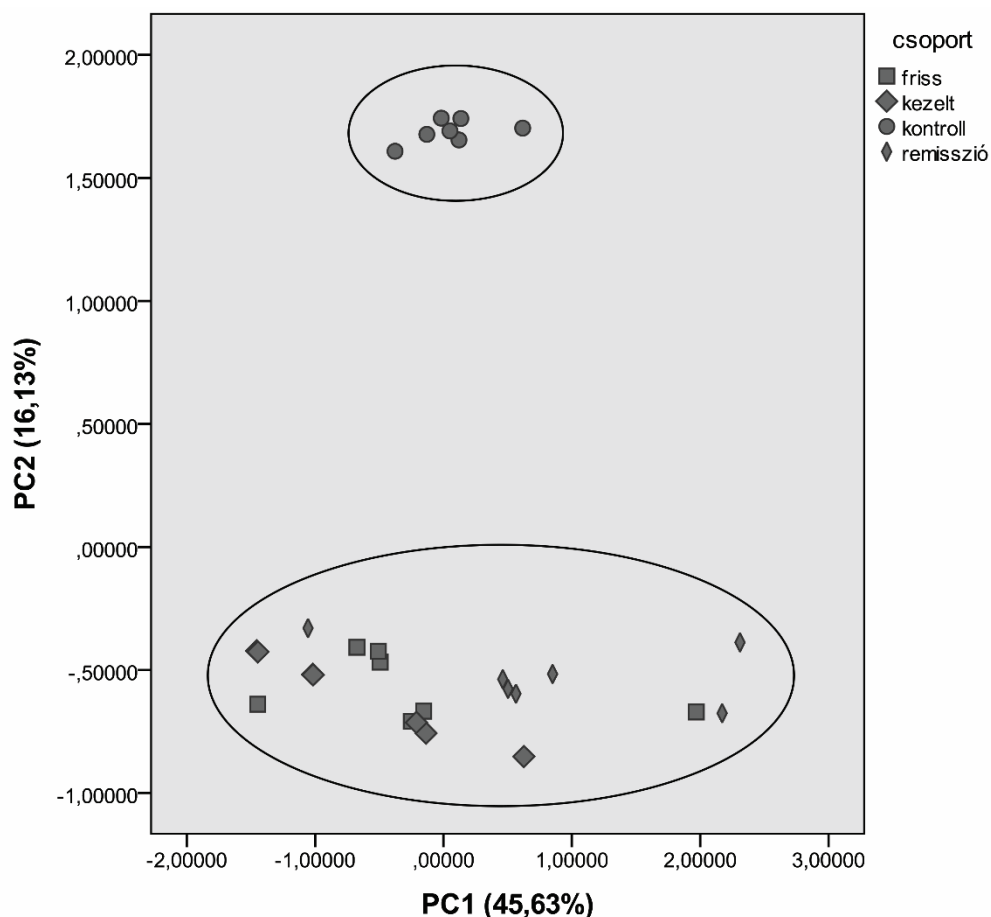
V.1.3. A statisztikai analízis eredményei

A statisztikai analízis során először a totál szérumból 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, amit a 15. ábrán mutatok be (egészséges kontroll, frissen diagnosztizált, kezelés alatt álló és remisszióban lévő MM betegek).



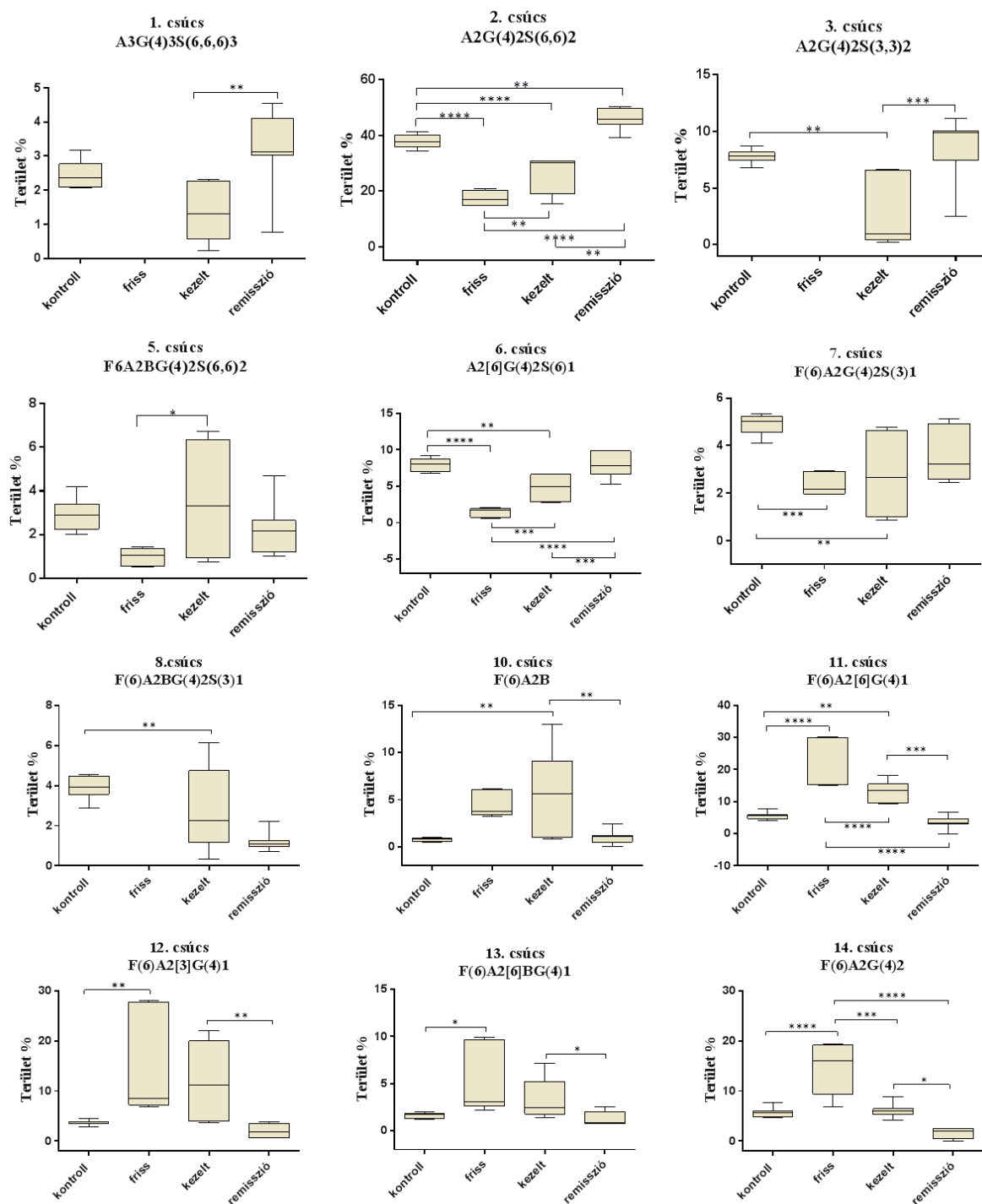
15. ábra: A vizsgált csoportok (egészséges kontroll, frissen diagnosztizált, kezelés alatt álló és remisszióban lévő MM betegek) totál szérum glikoforma eltéréseinek főkomponens analízise a főkomponens tengelyek %-os értékeivel ábrázolva.

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 (16. ábra).

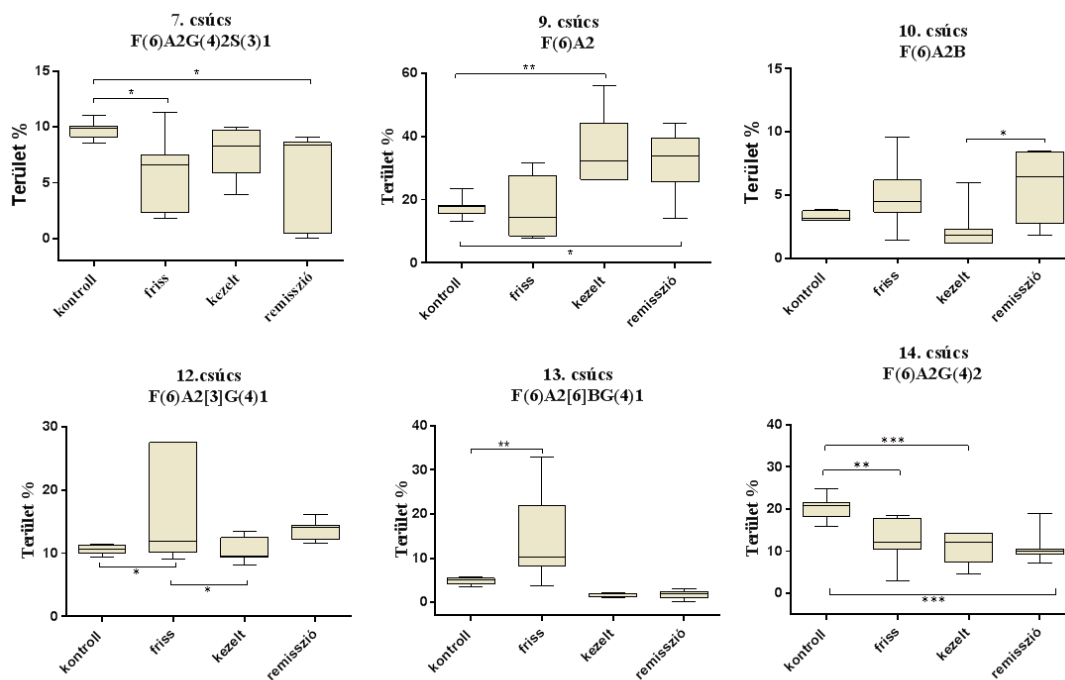


16. ábra: A vizsgált csoportok (egészséges kontroll, frissen diagnosztizált, kezelés alatt álló és remisszióban lévő MM betegek) IgG Fc glikoforma eltéréseinek főkomponens analízise a főkomponens tengelyek %-os értékeivel ábrázolva.

A 17. és 18. ábra mutatja be azokat a komplex cukor struktúrákat, amelyek szignifikáns változást mutattak a totál szérumban, illetve az IgG Fc fragmentumainak N-glikán analízise kapcsán a négy vizsgált csoportban. Az egyváltozós variancia-analízis (ANOVA) statisztikai szempontból szignifikáns különbséget mutatott a vizsgált négy csoport átlagos százalékos csúcs alatti terület (PeakArea%) értékeiben az alább bemutatott cukrok esetén.



17. ábra: A szignifikáns eltérést mutató N-glikán struktúrák totál szérumban.



18. ábra: A szignifikáns eltérést mutató N-glikán struktúrák papain emésztett Ig G nehézlánc mintákban.

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. Az alábbiakban az egyes N-glikán struktúrákhoz tartozó PeakArea% értékek standard hibáját mutatom be a totál szérumban (2. táblázat) és IgG frakcióban (3. táblázat) N-glikánjainak szintjén. A szérumban A3G(4)3S(6,6,6)3 komponensére kapott átlag \pm standard hiba értéke kontroll minta esetében $2,496 \pm 0,158^{ab}$ volt. A felső indexben lévő *a* és *b* betűk azt jelzik, hogy az adott struktúrára vonatkozóan milyen kapcsolat van a vizsgálati csoportok között. A frissen diagnosztizált csoport esetén ez a cukor struktúra nem jelent meg a mintában. A kontrollal összevetve a kezelt csoport nem mutatott jelentős különbséget így mind a két csoportnál szerepel az *a* betű. A remissziós betegek mintái sem különböztek a kontrolltól szignifikánsan így itt is mind a két csoportba került egy *b* betű. Azonban a kezelt és

remissziós csoportok között szignifikáns eltérést találtam ennek a struktúrának a jelenlétére vonatkozólag ennek megfelelően különböznek a betűk is, melyek a szignifikáns eltérést jelölik. Továbbá minél kisebb a standard hiba értéke a vizsgált csoportokon belül az eredmények annál jobban közelítették az átlag tényleges értékét. A legtöbb esetben a standard hiba egy alatt volt, tehát a legtöbb csúcs értéke közelítette az átlag tényleges értékét.

2. táblázat: Teljes szérum N-glikán struktúráinak átlag PeakAreas% \pm standard hiba értékei. $n = 7$ kísérleti csoportonként. ^{a-d} A sorokon belül, a felső indexben szereplő eltérő betűk szignifikáns eltérést jelölnek ($p < 0,05$) egyváltozós variancia analízis alapján (ANOVA).

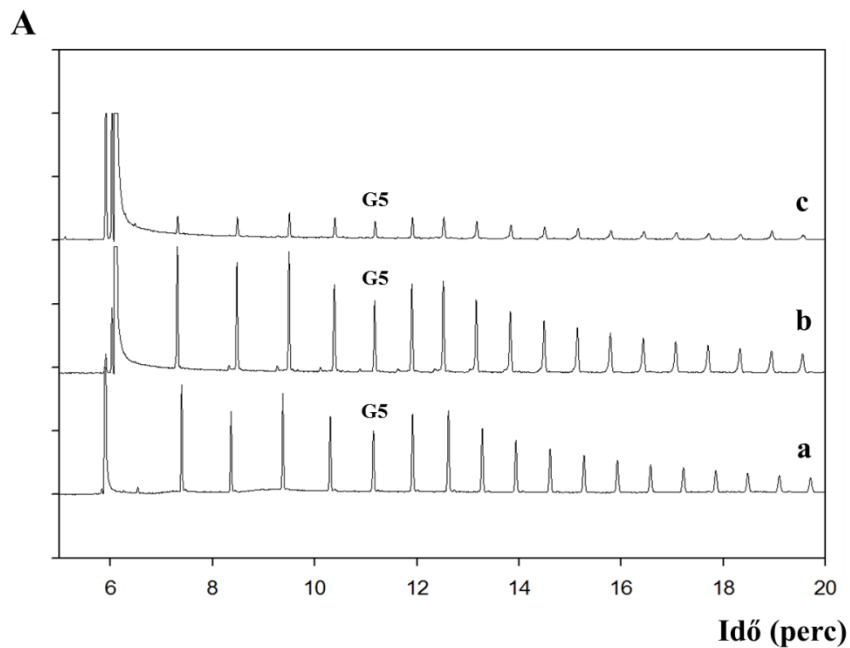
Csúcs száma	Struktúra	Kísérleti csoportok			
		Kontroll	Kezeletlen	Kezelt	Remisszió
1	A3G(4)3S(6,6,6)3	2,496 \pm 0,158 ^{ab}	-	1,340 \pm 0,324 ^a	3,194 \pm 0,458 ^b
2	A2G(4)2S(6,6)2	37,78 \pm 0,925 ^a	17,28 \pm 0,913 ^b	25,42 \pm 2,513 ^c	46,24 \pm 1,520 ^d
3	A2G(4)2S(3,3)2	7,783 \pm 0,224 ^a	-	2,410 \pm 1,093 ^b	8,653 \pm 1,103 ^a
4	F(6)A2[6]G(4)2S(6,6)2	3,890 \pm 0,236 ^a	3,393 \pm 0,197 ^a	2,839 \pm 0,817 ^a	4,761 \pm 0,820 ^a
5	F(6)A2BG(4)2S(6,6)2	2,954 \pm 0,275 ^{ab}	1,023 \pm 0,138 ^a	3,619 \pm 0,934 ^b	2,303 \pm 0,455 ^{ab}
6	A2[6]G(4)2S(6)1	7,991 \pm 0,336 ^a	1,486 \pm 0,221 ^b	4,914 \pm 0,628 ^c	8,121 \pm 0,684 ^a
7	F(6)A2G(4)2S(3)1	4,883 \pm 0,166 ^a	2,384 \pm 0,165 ^b	2,640 \pm 0,636 ^b	3,566 \pm 0,421 ^{ab}
8	F(6)A2BG(4)2S(3)1	3,923 \pm 0,233 ^a	-	2,777 \pm 0,810 ^{ab}	1,209 \pm 0,181 ^b
9	F(6)A2	6,183 \pm 0,229 ^a	10,55 \pm 1,631 ^a	11,81 \pm 2,425 ^a	7,009 \pm 0,702 ^a
10	F(6)A2B	0,764 \pm 0,076 ^a	4,274 \pm 0,487 ^{ab}	5,921 \pm 1,714 ^b	1,070 \pm 0,283 ^a
11	F(6)A2[6]G(4)1	5,527 \pm 0,445 ^a	24,86 \pm 2,666 ^b	13,19 \pm 1,186 ^c	3,424 \pm 0,756 ^a
12	F(6)A2[3]G(4)1	3,694 \pm 0,186 ^a	16,19 \pm 4,006 ^b	11,31 \pm 2,854 ^{ab}	2,021 \pm 0,478 ^a
13	F(6)A2[6]BG(4)1	1,641 \pm 0,112 ^a	4,799 \pm 1,296 ^b	3,483 \pm 0,798 ^{ab}	1,280 \pm 0,273 ^a
14	F(6)A2G(4)2	5,644 \pm 0,398 ^a	13,77 \pm 1,910 ^b	6,091 \pm 0,537 ^{ac}	1,667 \pm 0,379 ^{ac}

3. táblázat: IgG N-glikán struktúrák átlag PeakArea% ± standard hiba értékei. n = 7 kísérleti csoportonként. ^{a-d} A sorokon belüli eltérő felső indexben szereplő betűk szignifikáns eltérést jelölnek (p <0,05) egyváltozós varianciaanalízis alapján (ANOVA).

Csúcs száma	Struktúra	Kísérleti csoportok			
		Kontroll	Kezeletlen	Kezelt	Remisszió
7	F(6)A2G(4)2S(3)1	9,759±0,294 ^a	5,647±1,341 ^a	7,479±0,837 ^a	5,620±1,516 ^a
9	F(6)A2	17,57±1,214 ^a	17,85±3,887 ^a	36,84±4,066 ^{bc}	31,02±3,804 ^{ac}
10	F(6)A2B	3,297±0,142 ^{ab}	4,943±0,955 ^{ab}	2,315±0,637 ^a	5,807±0,983 ^b
11	F(6)A2[6]G(4)1	23,76±0,473 ^a	28,04±4,467 ^a	28,39±2,596 ^a	25,16±1,998 ^a
12	F(6)A2[3]G(4)1	10,52±0,284 ^a	17,15±3,150 ^b	10,30±0,719 ^a	13,81±0,571 ^{ab}
13	F(6)A2[6]BG(4)1	4,750±0,312 ^a	13,79±3,826 ^b	1,428±0,182 ^a	1,814±0,343 ^a
14	F(6)A2G(4)2	20,48±1,050 ^a	12,57±1,977 ^b	10,59±1,382 ^b	10,80±1,418 ^b

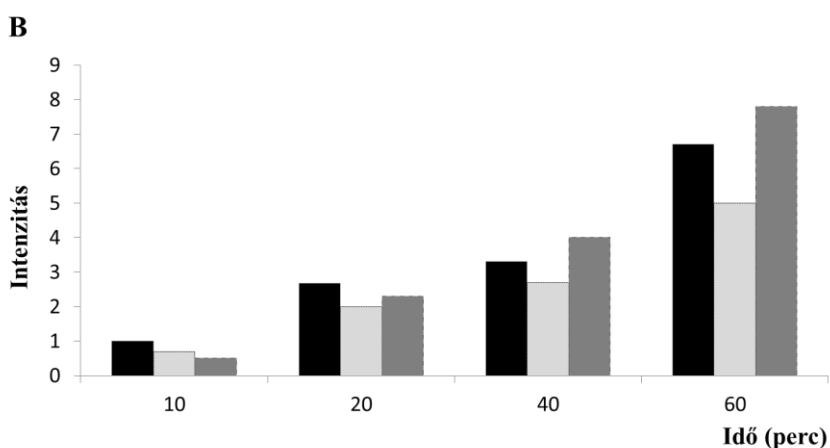
V.2.1. Irídium- és ruténium-foszfin komplexek hatása a fluorofór jelölés kihozatalára

Az $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtppps})_3]$ és $[\text{RuCl}_2(\text{mtppps})_2]$ vegyületek katalitikus hatását kihasználva 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 vizsgálatot háromszor ismételt meg és egyidejűleg 5 párhuzamos mintával dolgoztam. Ennek során a standard maltooligoszacharid létra elektroferogramjaival a különböző redukáló szerek segítségével folytatott fluorofór jelölés hatékonyságát hasonlítottam össze a 19 **A** ábrán. A mennyiségi értékeléshez a maltopentóz (G5 oligomer) átlagos csúcsmagasságát határoztam meg. Amint az 19 **B** ábrán is látható az APTS jelölt maltopentóz csúcsintenzitása nagy hasonlóságot mutatott a NaBH_3CN és a $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtppps})_3]$ komplex segítségével történt jelölés során, míg azonos moláris koncentráció esetén a $[\text{RuCl}_2(\text{mtppps})_2]$ komplex jelölés esetén alacsonyabb csúcsintenzitást kaptam.



19 A. ábra: APTS jelölt maltooligoszacharid minták CE-LIF analízise NaBH_3CN (a) használatával, illetve $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3]$ (b) vagy $[\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2]$ (c) katalizátorokkal (a két utóbbi HCOOH hidrogén donor alkalmazása mellett, 60 perces inkubációs idő esetén).

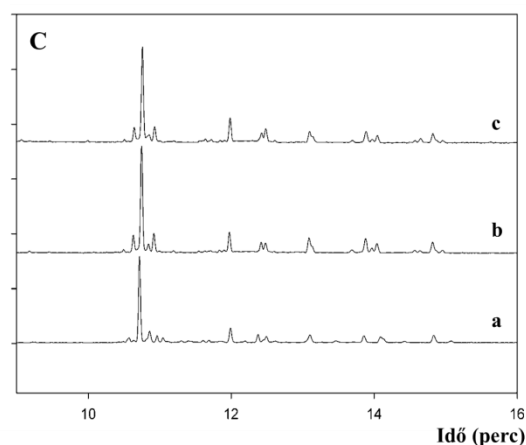
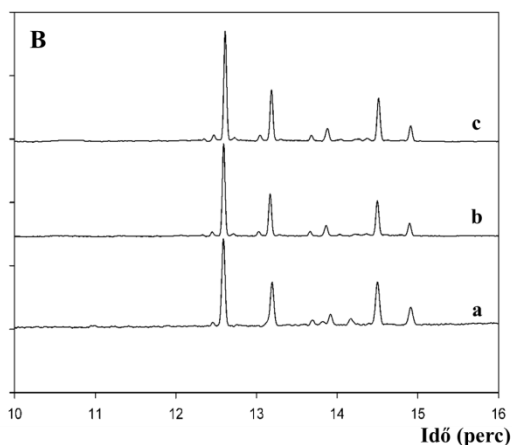
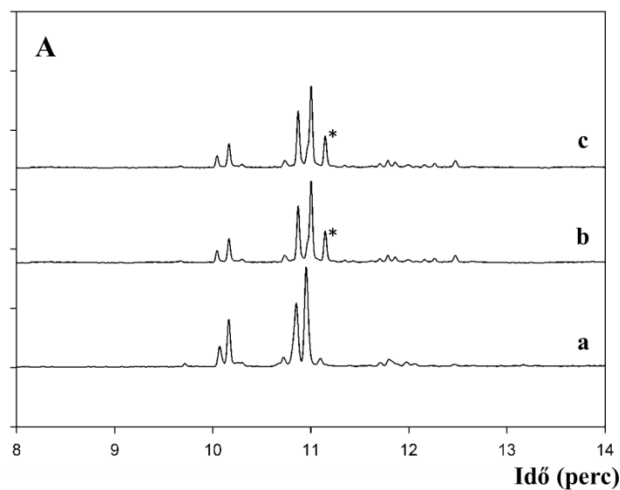
G5: maltopentóz. Elválasztási körülmények: BFS kapilláris 50 cm effektív hossz (teljes hossz 60 cm, 50 μm ID); NCHO elválasztó puffer; Elválasztási hőmérséklet: 20 °C; Alkalmazott feszültség: 30 kV (0,17 perc ramp) fordított polaritás; Injektálás: 1,0 psi, 5 sec.



19 B. ábra: A maltopentóz csúcs intenzitása redukív aminálási reakcióban NaBH_3CN (sötétszürke), $\text{HCOOH}/[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3]$ (fekete) és $\text{HCOOH}/[\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2]$ (szürke) alkalmazásával. Mindegyik esetben 55 °C volt az inkubálási hőmérséklet.

V.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. Amint a 20. ábrán látható, a CE-LIF elektroferogrammok 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. A biológiai minták esetén minden mérést öt alkalommal végeztem el és egyidejűleg három párhuzamos mintával dolgoztam. Kiemelném, hogy a fetuin (20 A. ábra) 11 percnél elváló erősen szialilált N-glikán struktúrái (középső **(b)** és felső **(c)** elektroferogrammok) nagyobbak voltak (a 20. A ábrán csillaggal jelöltem a megfelelő struktúrákat), ami arra utal, hogy ezek a jelölési reakciók stabilabbak, szignifikánsan kisebb a szialsav vesztés. A 20 B és C ábrákon a ribonukleáz B és a humán szérum glikoproteinek N-glikán profiljait ábrázoltam. Látható, hogy mind a három típusú fent említett jelölési eljárás során azonos jelölési hatékonyságot értem el.

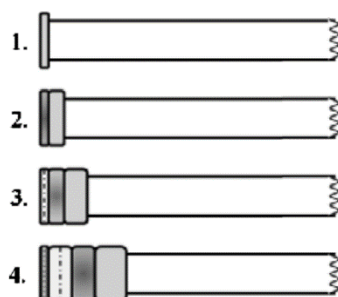


20. ábra: APTS jelölt fetuin (A), ribonukleáz B (B) és humán plazma (C) N-glikánjainak CE-LIF analízise NaBH_3CN (a), $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3]$ (b) vagy $[\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2]$ (c) katalizátorok használatával (ez utóbbi kettő HCOOH hidrogén donor alkalmazása mellett). Az elválasztás körülményei megegyeztek a 19. ábrán feltüntetettekkel.

V.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. Ahogy a 21. ábra bemutatja, 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.

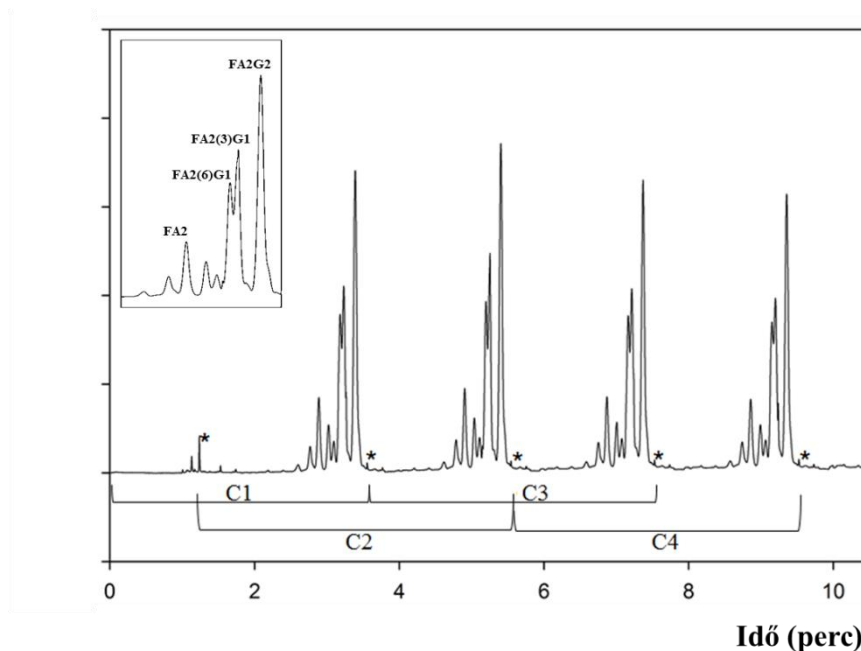


21. ábra: Elválasztási ablak-függő sorozatos injektálás (SWDMI) sematikus ábrázolása. Egymás után injektált minta dugókat különböző mintázattal jelöltem.

V.3.2. Nyomással történő injektálás SWDMI módban

A 22. ábra négy IgG N-glikán minta CE-LIF profilját mutatja be nyomással injektált SWDMI elválasztás alkalmazásakor. Az analízis 20 cm-es effektív hosszúságú kapillárison történt. A négy injektálás eredményeképpen kapott elektroferogram részeket a C1-C4 jelölt blokkok reprezentálják. 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) kapcsolófeszültség 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 (C1) során 2,61 percnél kezdtek megjelenni, és a szeparációs ablak 1,14 perc hosszúságú volt. Kiemelném, hogy a minta komponensek tényleges elválását nem szakították meg az egymást követő injektálási lépések, így azok rendben elhaladtak a detektor ablak előtt, ennek köszönhetően a csúcsmintázat mindig megfelelően 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 percnél volt látható. A második mintát a C1 ciklus közepén injektáltam be és az első ciklus a C2 minta elválasztásának közepén fejeződött be. Ekkor injektáltam a harmadik mintát a második minta injektálási paramétereinek megfelelően és ennek megfelelően a negyedik mintát akkor injektáltam, amikor a második minta APTS csúcsát a C3 ciklus során detektáltam. Ennek a koncepciónak az alkalmazásával a négy minta teljes analízise kevesebb, mint 10 percet vett igénybe. Felhívnom a figyelmet arra, hogy négy teljes ciklusban történő elválasztás ugyanerre a négy mintára 36 percet vett volna igénybe.

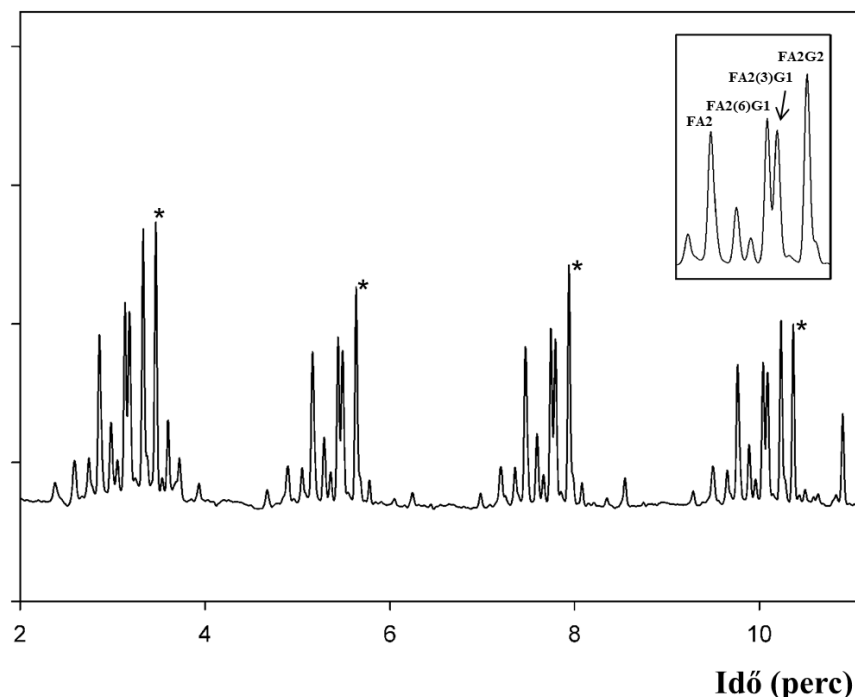


22. ábra: APTS-el jelölt IgG N-glikán struktúrák szeparációs ablak-függő nyomással történő sorozatos injektálása (SWDMI). A C1–C4 intervallumok az injektálási ciklusokat, valamint azok idejét jelölik. Az APTS csúcsokat csillag jelöli (*). A keretben lévő nagyított ábrán az IgG N-glikánok legfontosabb csúcsait jelöltem be: FA2; FA2(6)G1; FA2(3)G1; FA2G2. Elválasztási körülmények: NCHO kapilláris hossza 30 cm (20 cm effektív hosszúság), 50 μ m ID, NCHO szeparáló puffer, Alkalmazott feszültség: 30 kV, Elválasztási hőmérséklet: 25 $^{\circ}$ C. Injektálás: 1,2 psi, 0,15 perc.

V.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, ahogy azt a 23. ábra bemutatja. Az ábrán az IgG szénhidrátok mellett csillaggal jelölt szabad APTS látható, melynek nagyobb mennyisége az elektrokinetikus injektálással magyarázható. Az elektrokinetikus injektálás részeként a mintát megelőzően egy ion depletált zónát alakítottam ki 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.

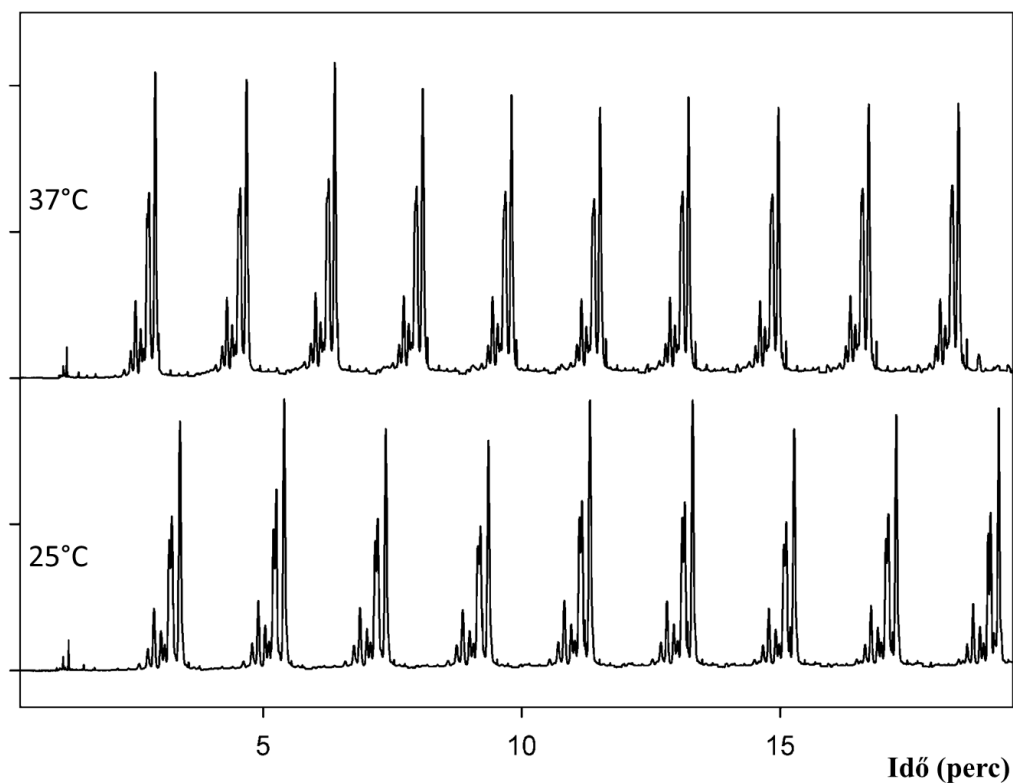


23. ábra: IgG N-glikánok elektrokinetikus injektálása szeparációs ablak-függő sorozatos injektálás esetén. A keretben lévő nagyított ábra az IgG N-glikánok legfontosabb csúcsait jelöli: FA2; FA2(6)G1; FA2(3)G1; FA2G2. Az elválasztási körülmények megegyeznek a 22. ábrán leírtakkal. Injektálási paraméterek: HPLC víz: 0,1 psi 0,1 perc (normál polaritás); minta: 2,3 kV 0,1 min (fordított polaritás); elválasztó puffer: 0,1 psi 0,1 min (normál polaritás).

V.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. A 24. ábrán bemutatom a 25 °C-on (alsó elektroferogram) és 37 °C-on (felső elektroferogram) elválasztott IgG N-glikán minták elektroferogramjait. Az analízis szempontjából fontos N-glikán minta csúcsok (FA2; FA2(6)G1; FA2(3)G1; FA2G2) ezen a magasabb hőmérsékleten is jól elváltak egymástól, amint azt a 22. ábrán látható felső elektroferogram mutatja. 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.



24. ábra: APTS-el jelölt humán IgG N-glikán struktúrák CE-LIF elválasztása 25 °C-on (alsó elektroferogram) és 37 °C-on, nyomással injektált SWDMI módban. Elválasztási körülmények: NCHO kapilláris hossza 30 cm (20 cm effektív hosszúság), 50 μ m ID, NCHO szeparáló puffer, Alkalmazott feszültség: 30 kV, Elválasztási hőmérséklet: 25 °C, illetve 37 °C. Injektálás: 1,2 psi, 0,15 perc.

VI. MEGBESZÉLÉS

VI.1. Myeloma multiplexes betegek szérum N-glikozilációja

Az N-glikánok biomarkernént való alkalmazása számos fejlődési rendellenesség [140, 141], autoimmun betegség [142-145] és daganatos elváltozás esetén rutinszerűvé válhat a jövőben, ugyanis számos irodalmi adat igazolja a glikozilációs változások meglétét. Prostatára rákban szenvedő páciensek teljes szérumában csökkent a core fukoziláció, míg az α 2,3-szialiláció aránya növekedett az egészséges kontroll, vagy a benignus prostata hyperplasia-val diagnosztizált páciensek mintáiban lévő arányokhoz képest [146, 147]. Petefészek rákban szenvedő betegekben a szérum IgG galaktozilációja csökkent, azonban növekedett a szialiláció mértéke a szérumban keringő haptoglobin béta-lánc, az alpha1-acid glikoprotein és az alpha1-antichymotrypsin esetében. Ezek a változások együttesen a glikoproteinek féléletidejének növekedését okozták [148, 149], melynek következtében az apoptózis mértéke csökkent, ami kedvezett a rákos sejtek túlélésének és rossz prognózist jelentett a betegek számára. A prognózis megállapítása befolyásolja a terápia beállítását, ami életmentő lehet a páciensek számára. Továbbá N-glikoziláció módosulásokat találtak nyelöcső rákos, gyomorrákos, vastagbél rákos, hasnyálmirigy rákos, epehólyag rákos, tüdőrákos [147] és tüdő daganatos betegségekben [150-153]. Follikuláris limfómában az IgG variábilis régiójának N-glikozilációs helyei szokatlanul magas mannozilációt mutattak, melyek kölcsönhatásba léptek mannóz specifikus lektinokkal különösen a dendritikus sejt specifikus fehérjével [154]. Ez a kölcsönhatás segítette a tumoros sejtek túlélését és proliferációját. Több más típusú hematológiai betegségben, mint akut lymphoblaszt leukémiában és Hodgkin lymphomában is ismert az N-glikoziláció módosulása [71]. Az említett hematológiai betegségek esetén a glikozilációs módosulások befolyásolják a betegség lefolyását és akár diagnosztikai értékűek is lehetnek. Ahogy korábban már említésre került mielóma multiplex-ben is több glikozilációs módosulás ismert. Ezért 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.

Mint fentebb említettem jelenleg két fehérje N-glikoziláció profilozást használnak diagnosztikai céllal a klinikumban. Az egyik ilyen fehérje a transferrin, melyen a glikoziláció hiánya az idült alkoholizmus jele, mivel a glikozil transzferázokat gátolja a szervezetben képződő acetaldehid [88-90]. A másik az alpha-fetoprotein, mely esetben a core α 1-6 fukoziláció szintje emelkedik máj karcinómás betegekben [91, 92]. A mielóma multiplex-es kísérleti 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 lenne.

VI.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) foszfín komplexek, nevezetesen $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtppps})_3]$ és $[\text{RuCl}_2(\text{mtppps})_2]$ 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 $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtppps})_3]$ alkalmazása a redukív aminálási reakció során nagyon hasonló jelölési hatékonyságokat mutatott a hagyományos NaBH_3CN használatának kihozatalával. Az ehhez képest jelentősen olcsóbb $[\text{RuCl}_2(\text{mtppps})_2]$ 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.

VI.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 minta komponens 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 egycsatornás 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 pozícionálása 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. Tehát ebben az esetben csak 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 volt a hőmérséklet emelésével, mely során 25 °C-ról 37 °C-ra növeltem az elválasztási hőmérséklet, így 230 percre sikerült leshorítani a teljes analízis időt 96 minta esetén.

VII. 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 injektálási (SWDMI) módszert, mely szignifikánsan csökkentette a teljes analízisidőt 864 percről 230 percre. A szeparációs ablakot úgy határoztam meg, mint az a migrációs idő tartomány, amely az összes minta komponens 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 analizésére 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 tálcá 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.

VI. SUMMARY

I studied the N-glycosylation of Fc and Fab κ / λ fragments of total serum and IgG of myeloma multiplex patients in CE-LIF to determine which test method would be better suited to provide results in practical clinical diagnostics. The ratio of sialylated and neutral N-glycoforms in total serum and IgG paraprotein Fc and Fab κ / λ fragments was significantly altered at the N-glycan level. Statistical data processing showed that the total serum N-glycosylation possessed higher information content since all patient groups (newly diagnosed, untreated, treated and remission) were clearly separable. This information is of great significance because allows accurate ISS classification of patients i.e., the selection of a proper treatment strategy, thus achieving longer survival and better quality of life.

I developed an alternative marking method for the pharmaceutical industry to examine of glycoforms by using transfer hydrogenation with $\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3$ and $[\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2]$ in the reduction amination reaction carbohydrates by APTS. The $\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3$ exhibited nearly the same labeling efficiency as of the conventional NaBH_3CN , while the much cheaper $[\text{RuCl}_2(\text{mtpms})_2]$ provided the desired efficacy only at a slightly higher concentrations (2.5 x). The use of these agents do not release acutely toxic hydrogen cyanide, therefore, offer a more environmentally friendly solution and eliminate the health risks, which accompanies the use of NaBH_3CN in large scale applications.

Finally, I developed the separation window dependent multiple injection (SWDMI) method for the easier and faster CE-LIF analysis of a large number of samples. The separation window was determined as the migration time window covering the actual separation of all sample components including the peak representing the APTS dye, what was the starting point of the time window. Every consecutive injection was implemented at the timepoint when the APTS peak of the preced-ing injection reached the detection window. The SWDMI method required longer processing time when electrokinetic injection was used (288 minutes for 96 samples). By the application of pressure injection, the total processing time was shorter due less tray movement requiring, only 240 minutes for 96 samples. Increasing the separation temperature from 25 to 37°C, further reduced the total processing time to 230 min.

VIII. IRODALOMJEGYZÉK

1. Lee, H.S. and C.K. Min, *Optimal maintenance and consolidation therapy for multiple myeloma in actual clinical practice*. Korean J Intern Med, 2016. **31**(5): p. 809-19.
2. Joó, F., *Aqueous Biphasic Hydrogenations*. Acc. Chem. Res., 2002. **35**(9): p. 738–745.
3. Ferenc, J., *Aqueous Organometallic Catalysis*. Springer, Dordrecht, 2001.
4. Papp, G., et al., *Highly efficient dehydrogenation of formic acid in aqueous solution catalysed by an easily available water-soluble iridium(iii) dihydride*. Dalton Trans, 2016. **45**(37): p. 14516-9.
5. in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2009: Cold Spring Harbor (NY).
6. Shrimal, S., N.A. Cherepanova, and R. Gilmore, *Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **41**: p. 71-8.
7. Spiro, R.G., *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology, 2002. **12**(4): p. 43R-56R.
8. Aebi, M., *N-linked protein glycosylation in the ER*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(11): p. 2430-7.
9. Varki, A., et al., *Symbol nomenclature for glycan representation*. Proteomics, 2009. **9**(24): p. 5398-9.
10. Marino, K., et al., *A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze*. Nat Chem Biol, 2010. **6**(10): p. 713-23.
11. Drickamer, M.E.T.a.K., *Introduction to Glycobiology*. 2011. **Third Edition**.
12. Butters, R.A.D.a.T.D., *Introduction: Glycobiology Understanding the Language and Meaning of Carbohydrates*. Chemical Reviews, 2002(102 (2)): p. pp 283–284.
13. Harvey Lodish, A.B., S. Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore and James Darnell, *Molecular Cell Biology (4th edition)* 2001(29.): p. 126-133.
14. Angata, K., et al., *Cellular and molecular analysis of neural development of glycosyltransferase gene knockout mice*. Methods Enzymol, 2006. **417**: p. 25-37.
15. Ajit Varki, E.E., Richard D Cummings, Jeffrey D Esko, Pamela Stanley, Gerald W Hart, Markus Aebi, Alan G Darvill, Taroh Kinoshita, Nicolle H Packer, James H

- Prestegard, Ronald L Schnaar, and Peter H Seeberger, *Essentials of Glycobiology*, 3rd edition. 2015-2017.
16. Ham, B.M., *Glycosylation of Proteins. Proteomics of Biological Systems: Protein Phosphorylation Using Mass Spectrometry Techniques*. 2011: p. 59-79.
 17. Chatterjee, B.P.C.a.M., *Glycosylation of Acute Phase Proteins: A Promising Disease Biomarker*. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 2014. **84**(4): p. pp 865–874.
 18. Chandler, K.B., et al., *Exploring site-specific N-glycosylation microheterogeneity of haptoglobin using glycopeptide CID tandem mass spectra and glycan database search*. J Proteome Res, 2013. **12**(8): p. 3652-66.
 19. Axford, J., *Glycobiology and medicine: an introduction*. J R Soc Med, 1997. **90**(5): p. 260-4.
 20. An, H.J., et al., *Glycomics and disease markers*. Curr Opin Chem Biol, 2009. **13**(5-6): p. 601-7.
 21. Taniguchi, N., et al., *The second golden age of glycomics: from functional glycomics to clinical applications*. J Proteome Res, 2009. **8**(2): p. 425-6.
 22. Schwarz, F. and M. Aebi, *Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation*. Curr Opin Struct Biol, 2011. **21**(5): p. 576-82.
 23. Ohtsubo, K. and J.D. Marth, *Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease*. Cell, 2006. **126**(5): p. 855-67.
 24. de-Freitas-Junior, J.C., et al., *N-glycan biosynthesis inhibitors induce in vitro anticancer activity in colorectal cancer cells*. J Cell Biochem, 2012. **113**(9): p. 2957-66.
 25. de Freitas Junior, J.C., et al., *Inhibition of N-linked glycosylation by tunicamycin induces E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and inhibits cell proliferation in undifferentiated human colon cancer cells*. Cancer Chemother Pharmacol, 2011. **68**(1): p. 227-38.
 26. JW., D., *Effects of Swainsonine and Polyinosinic-Polycytidylic Acid on Murine Tumor-Cell Growth and Metastasis*. Cancer Research, 1986(46(10)): p. 5131-5136.
 27. Humphries, M.J., et al., *An assessment of the effects of swainsonine on survival of mice injected with B16-F10 melanoma cells*. Clin Exp Metastasis, 1990. **8**(1): p. 89-102.
 28. Dennis, J.W., et al., *Growth inhibition of human melanoma tumor xenografts in athymic nude mice by swainsonine*. Cancer Res, 1990. **50**(6): p. 1867-72.

29. Sun, S., et al., *Comprehensive analysis of protein glycosylation by solid-phase extraction of N-linked glycans and glycosite-containing peptides*. Nat Biotechnol, 2016. **34**(1): p. 84-8.
30. Windwarder, M. and F. Altmann, *Site-specific analysis of the O-glycosylation of bovine fetuin by electron-transfer dissociation mass spectrometry*. J Proteomics, 2014. **108**: p. 258-68.
31. Brockhausen, I., *Glycobiology Protocols*. 2006. **347**.
32. Dr. András Guttman, F.-T.A.C., Ramon A. Evangelist, *Separation of 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate-labeled asparagine-linked fetuin glycans by capillary gel electrophoresis*. Electrophoresis, 1996. **17**(2): p. 412–417.
33. Lodish, H., *Protein Glycosylation in the ER and Golgi Complex*. Molecular Cell Biology., 2000. **4th edition**.
34. Klapoetke, S., et al., *The evaluation of a novel approach for the profiling and identification of N-linked glycan with a procainamide tag by HPLC with fluorescent and mass spectrometric detection*. J Pharm Biomed Anal, 2010. **53**(3): p. 315-24.
35. Blanchard, V., et al., *The structural basis of the difference in sensitivity for PNGase F in the de-N-glycosylation of the native bovine pancreatic ribonucleases B and BS*. Biochemistry, 2008. **47**(11): p. 3435-46.
36. Gutierrez Gallego, R., et al., *Identification of carbohydrates binding to lectins by using surface plasmon resonance in combination with HPLC profiling*. Glycobiology, 2004. **14**(5): p. 373-86.
37. Guttman, A. and T. Pritchett, *Capillary gel electrophoresis separation of high-mannose type oligosaccharides derivatized by 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonic acid*. Electrophoresis, 1995. **16**(10): p. 1906-11.
38. Spiegelberg, H.L., *Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses*. Adv Immunol, 1974. **19**(0): p. 259-94.
39. Natvig, J.B. and H.G. Kunkel, *Human immunoglobulins: classes, subclasses, genetic variants, and idiotypes*. Adv Immunol, 1973. **16**: p. 1-59.
40. Arnold, J.N., et al., *The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 21-50.
41. JM Austyn, K.W., NA Staines, *Principles of cellular and molecular immunology*. Wiley Online Library, 1993.

42. Abul K. Abbas, A.H.H.L., Shiv Pillai, *Cellular and Molecular Immunology Student Consult*. Elsevier Health Sciences, 2014.
43. Clarissa Pilkington, G.R., David A. Isenberg, *Glycosylation of Immunoglobulins*. Clinical Immunotherapeutics, 1994. **1**(3): p. 169–172.
44. Jefferis, R., et al., *A comparative study of the N-linked oligosaccharide structures of human IgG subclass proteins*. Biochem J, 1990. **268**(3): p. 529-37.
45. Huhn, C., et al., *IgG glycosylation analysis*. Proteomics, 2009. **9**(4): p. 882-913.
46. Abes, R. and J.L. Teillaud, *Impact of Glycosylation on Effector Functions of Therapeutic IgG*. Pharmaceuticals (Basel), 2010. **3**(1): p. 146-157.
47. Bones, J., et al., *Ultra performance liquid chromatographic profiling of serum N-glycans for fast and efficient identification of cancer associated alterations in glycosylation*. Anal Chem, 2010. **82**(24): p. 10208-15.
48. Mittermayr, S., et al., *Multiplexed analytical glycomics: rapid and confident IgG N-glycan structural elucidation*. J Proteome Res, 2011. **10**(8): p. 3820-9.
49. Forthal, D.N., et al., *Fc-glycosylation influences Fcγ receptor binding and cell-mediated anti-HIV activity of monoclonal antibody 2G12*. J Immunol, 2010. **185**(11): p. 6876-82.
50. Jiang, X.R., et al., *Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(2): p. 101-11.
51. Buck, P.M., S. Kumar, and S.K. Singh, *Consequences of glycan truncation on Fc structural integrity*. MAbs, 2013. **5**(6): p. 904-16.
52. Raju, T.S., *Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(4): p. 471-8.
53. Jefferis, R., *Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action*. Trends Pharmacol Sci, 2009. **30**(7): p. 356-62.
54. Jefferis, R., *Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(3): p. 226-34.
55. Jefferis, R., *Glycosylation of recombinant antibody therapeutics*. Biotechnol Prog, 2005. **21**(1): p. 11-6.
56. Kondo, A., et al., *From glycomics to functional glycomics of sugar chains: Identification of target proteins with functional changes using gene targeting mice and knock down cells of FUT8 as examples*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1764**(12): p. 1881-9.

57. Hart, G.W. and R.J. Copeland, *Glycomics hits the big time*. Cell, 2010. **143**(5): p. 672-6.
58. Boyd, P.N., A.C. Lines, and A.K. Patel, *The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H*. Mol Immunol, 1995. **32**(17-18): p. 1311-8.
59. Thomann, M., et al., *Fc-galactosylation modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity of therapeutic antibodies*. Mol Immunol, 2016. **73**: p. 69-75.
60. Hodoniczky, J., Y.Z. Zheng, and D.C. James, *Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro*. Biotechnol Prog, 2005. **21**(6): p. 1644-52.
61. Reusch, D. and M.L. Tejada, *Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes*. Glycobiology, 2015. **25**(12): p. 1325-34.
62. Yu, M., et al., *Production, characterization, and pharmacokinetic properties of antibodies with N-linked mannose-5 glycans*. MAbs, 2012. **4**(4): p. 475-87.
63. Jarvas, G., et al., *Triple-Internal Standard Based Glycan Structural Assignment Method for Capillary Electrophoresis Analysis of Carbohydrates*. Anal Chem, 2016. **88**(23): p. 11364-11367.
64. Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, *Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma*. Leukemia, 2009. **23**(1): p. 3-9.
65. Rajkumar, S.V., *Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2016. **35**: p. e418-23.
66. Paiva, B., J.J. van Dongen, and A. Orfao, *New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma*. Blood, 2015. **125**(20): p. 3059-68.
67. Chapman, M.A., et al., *Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma*. Nature, 2011. **471**(7339): p. 467-72.
68. Banerjee, D.K., *N-glycans in cell survival and death: cross-talk between glycosyltransferases*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(9): p. 1338-46.
69. Zhang, X.L., *Roles of glycans and glycopeptides in immune system and immune-related diseases*. Curr Med Chem, 2006. **13**(10): p. 1141-7.
70. Kazuno, S., et al., *Glycosylation status of serum immunoglobulin G in patients with prostate diseases*. Cancer Med, 2016. **5**(6): p. 1137-46.

71. Lauc, G., et al., *Loci associated with N-glycosylation of human immunoglobulin G show pleiotropy with autoimmune diseases and haematological cancers*. PLoS Genet, 2013. **9**(1): p. e1003225.
72. Farooq, M., et al., *Glycosylation of polyclonal and paraprotein IgG in multiple myeloma*. Glycoconj J, 1997. **14**(4): p. 489-92.
73. Wright, A. and S.L. Morrison, *Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering*. Trends Biotechnol, 1997. **15**(1): p. 26-32.
74. Mimura, Y., et al., *Contrasting glycosylation profiles between Fab and Fc of a human IgG protein studied by electrospray ionization mass spectrometry*. J Immunol Methods, 2007. **326**(1-2): p. 116-26.
75. Radcliffe, C.M., et al., *Human follicular lymphoma cells contain oligomannose glycans in the antigen-binding site of the B-cell receptor*. J Biol Chem, 2007. **282**(10): p. 7405-15.
76. Glavey, S.V., et al., *The sialyltransferase ST3GAL6 influences homing and survival in multiple myeloma*. Blood, 2014. **124**(11): p. 1765-76.
77. Chen, J., et al., *Serum N-Glycans: A New Diagnostic Biomarker for Light Chain Multiple Myeloma*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0127022.
78. Mittermayr, S., et al., *Polyclonal Immunoglobulin G N-Glycosylation in the Pathogenesis of Plasma Cell Disorders*. J Proteome Res, 2017. **16**(2): p. 748-762.
79. International Myeloma Working, G., *Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group*. Br J Haematol, 2003. **121**(5): p. 749-57.
80. Greipp, P.R., et al., *International staging system for multiple myeloma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(15): p. 3412-20.
81. Stavenhagen, K., D. Kolarich, and M. Wuhrer, *Clinical Glycomics Employing Graphitized Carbon Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. Chromatographia, 2015. **78**(5-6): p. 307-320.
82. Wiegandt, A. and B. Meyer, *Unambiguous characterization of N-glycans of monoclonal antibody cetuximab by integration of LC-MS/MS and (1)H NMR spectroscopy*. Anal Chem, 2014. **86**(10): p. 4807-14.
83. Szabo, Z., et al., *Improved sample preparation method for glycan analysis of glycoproteins by CE-LIF and CE-MS*. Electrophoresis, 2010. **31**(8): p. 1389-95.
84. Rustandi, R.R., C. Anderson, and M. Hamm, *Application of capillary electrophoresis in glycoprotein analysis*. Methods Mol Biol, 2013. **988**: p. 181-97.

85. Guttman, A., *High-resolution carbohydrate profiling by capillary gel electrophoresis*. *Nature*, 1996. **380**(6573): p. 461-2.
86. Vo-Dinh, T., *Biomedical Photonics Handbook, Second Edition: Biomedical Diagnostics*. 2014: p. 178-188.
87. Callewaert, N., et al., *Noninvasive diagnosis of liver cirrhosis using DNA sequencer-based total serum protein glycomics*. *Nat Med*, 2004. **10**(4): p. 429-34.
88. De Feo, T.M., et al., *Carbohydrate-deficient transferrin, a sensitive marker of chronic alcohol abuse, is highly influenced by body iron*. *Hepatology*, 1999. **29**(3): p. 658-63.
89. Fallgatter, A.R.H.K.M.S.S.K.A.S.A.J., *CARBOHYDRATE-DEFICIENT TRANSFERRIN IS ELEVATED IN CATABOLIC FEMALE PATIENTS*. *Alcohol and Alcoholism*, 2001. **36**(6): p. 603–607.
90. Bortolotti, F., G. De Paoli, and F. Tagliaro, *Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: a critical review of the literature 2001-2005*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006. **841**(1-2): p. 96-109.
91. Gish, R.G., *Early detection of hepatocellular carcinoma through surveillance using biomarkers*. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 2014. **10**(2): p. 121-3.
92. Goldman, R., et al., *Detection of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(5): p. 1808-13.
93. de Jong, G. and H.G. van Eijk, *Functional properties of the carbohydrate moiety of human transferrin*. *Int J Biochem*, 1989. **21**(3): p. 253-63.
94. Vitale, A., et al., *Personalized treatment of patients with very early hepatocellular carcinoma*. *J Hepatol*, 2017. **66**(2): p. 412-423.
95. Taniguchi, N. and J.C. Paulson, *Frontiers in glycomics; bioinformatics and biomarkers in disease. September 11-13, 2006 Natcher Conference Center, NIH Campus, Bethesda, MD, USA*. *Proteomics*, 2007. **7**(9): p. 1360-3.
96. Wuhrer, M., *Glycosylation profiling in clinical proteomics: heading for glycan biomarkers*. *Expert Rev Proteomics*, 2007. **4**(2): p. 135-6.
97. Wiederschain, G., *Glycobiology and Human Diseases*. 2016: p. 37-49.
98. Varadi, C., C. Lew, and A. Guttman, *Rapid magnetic bead based sample preparation for automated and high throughput N-glycan analysis of therapeutic antibodies*. *Anal Chem*, 2014. **86**(12): p. 5682-7.
99. Ruhaak, L.R., et al., *Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification*. *Anal Bioanal Chem*, 2010. **397**(8): p. 3457-81.

100. Callewaert, N., et al., *Ultrasensitive profiling and sequencing of N-linked oligosaccharides using standard DNA-sequencing equipment*. *Glycobiology*, 2001. **11**(4): p. 275-81.
101. Jackson, P., *The use of polyacrylamide-gel electrophoresis for the high-resolution separation of reducing saccharides labelled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid. Detection of picomolar quantities by an imaging system based on a cooled charge-coupled device*. *Biochem J*, 1990. **270**(3): p. 705-13.
102. Evangelista, R.A., A. Guttman, and F.T. Chen, *Acid-catalyzed reductive amination of aldoses with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate*. *Electrophoresis*, 1996. **17**(2): p. 347-51.
103. Ruhaak, L.R., et al., *2-picoline-borane: a non-toxic reducing agent for oligosaccharide labeling by reductive amination*. *Proteomics*, 2010. **10**(12): p. 2330-6.
104. Locke, D., et al., *Neutral, acidic, and basic derivatives of anthranilamide that confer different formal charge to reducing oligosaccharides*. *Carbohydr Res*, 2004. **339**(2): p. 221-31.
105. Dalpathado, D.S., et al., *Reductive amination of carbohydrates using NaBH(OAc)₃*. *Anal Bioanal Chem*, 2005. **381**(6): p. 1130-7.
106. Wang, D. and D. Astruc, *The golden age of transfer hydrogenation*. *Chem Rev*, 2015. **115**(13): p. 6621-86.
107. Papp, G., et al., *Classical and non-classical phosphine-Ru(II)-hydrides in aqueous solutions: many, various, and useful*. *Dalton Trans*, 2013. **42**(2): p. 521-9.
108. Attila Bényei, F.J., *Organometallic catalysis in aqueous solutions: the biphasic transfer hydrogenation of aldehydes catalyzed by water-soluble phosphine complexes of ruthenium, rhodium and iridium*. *Journal of Molecular Catalysis*, 1990. **58**(2): p. 151-163.
109. Mohammad, J.R.P.A., *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*. 2001: p. 21-58.
110. Zhu, Z., J.J. Lu, and S. Liu, *Protein separation by capillary gel electrophoresis: a review*. *Anal Chim Acta*, 2012. **709**: p. 21-31.
111. Paul D. Grossman, J.C.C., *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*. 2012.

112. Kerekgyarto, M., et al., *Ultrafast haplotyping of putative microRNA-binding sites in the WFS1 gene by multiplex polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis*. J Chromatogr A, 2013. **1286**: p. 229-34.
113. Satinder Ahuja, M.J., *Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis, 1st Edition*. 2008. **Volume 9**.
114. Volpi, N., *Capillary Electrophoresis of Carbohydrates From Monosaccharides to Complex Polysaccharides*. 2011.
115. Li, S.E.Y., *Detection Techniques, in Journal of Chromatography Library, 1st edn*. 2009: p. 55-154

116. TISELIUS, A.R.W.K., *Electrophoresis and adsorption analysis as aids in investigations of large molecular weight substances and their breakdown products*. Nobel Lectures in Chemistry 1942 – 1962, 1948.
117. Andrews, A.T., *Electrophoresis : theory, techniques, and biochemical and clinical applications 2nd edition* 1986.
118. Stokes, G.G., Trans. Camb. Phil. Soc. , 1985(8): p. 287-305.
119. Eyring, H., Polanyi, M., , Z. Phys. Chem. Abt. B, 1931. **12**: p. 279-311.
120. Szoke, M., M. Sasvari-Szekely, and A. Guttman, *Ultra-thin-layer agarose gel electrophoresis. I. Effect of the gel concentration and temperature on the separation of DNA fragments*. J Chromatogr A, 1999. **830**(2): p. 465-71.
121. Arrhenius, S.A., Z. Physik. Chem. , 1889,. **4**, : p. 96-116.
122. Karger, B.L., A.S. Cohen, and A. Guttman, *High-performance capillary electrophoresis in the biological sciences*. J Chromatogr, 1989. **492**: p. 585-614.
123. Reinhard Kuhn, S.H.-K., *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*. 2013.
124. Macarron, R., et al., *Impact of high-throughput screening in biomedical research*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(3): p. 188-95.
125. Guttman, A., *Bioanalytical Tools for the Characterization of Biologics and Biosimilars*. LC.GC, 2012. **30**(5): p. 412–421.
126. Williams, W.A., et al., *Oligonucleotide analysis by sequential injection before analysis (SIBA) capillary electrophoresis*. Anal Biochem, 2003. **313**(1): p. 183-5.
127. Geiser, L., S. Rudaz, and J.L. Veuthey, *Decreasing analysis time in capillary electrophoresis: validation and comparison of quantitative performances in several approaches*. Electrophoresis, 2005. **26**(12): p. 2293-302.

128. Geiser, L., S. Rudaz, and J.L. Veuthey, *Validation of capillary electrophoresis--mass spectrometry methods for the analysis of a pharmaceutical formulation*. *Electrophoresis*, 2003. **24**(17): p. 3049-56.
129. Staub, A., et al., *Multiple injection technique for the determination and quantitation of insulin formulations by capillary electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry*. *J Chromatogr A*, 2010. **1217**(51): p. 8041-7.
130. Loden, H., et al., *Quantitative determination of salbutamol in tablets by multiple-injection capillary zone electrophoresis*. *J Chromatogr A*, 2008. **1207**(1-2): p. 181-5.
131. Kuehnbaum, N.L., A. Kormendi, and P. Britz-McKibbin, *Multisegment injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry: a high-throughput platform for metabolomics with high data fidelity*. *Anal Chem*, 2013. **85**(22): p. 10664-9.
132. C. Hudson, *Increasing throughput with multi-Segment-Injection-Capillaryelectrospray ionization-Mass spectrometry (MSI-CESI-MS)*, . 2015.
133. Szigeti, M., et al., *Fully Automated Sample Preparation for Ultrafast N-Glycosylation Analysis of Antibody Therapeutics*. *J Lab Autom*, 2016. **21**(2): p. 281-6.
134. F. Joó, J.K., A. Kathó, A.C. Bényei, T. Decuir, D.J. Darensbourg, A. Miedaner, D.L. Dubois, , *Ligands for water-solubilizing organometallic compounds: 1.(Meta-sulfonatophenyl)diphenylphosphine, sodium salt and its complexes with rhodium(I), ruthenium(II), iridium(I)*, . *Inorg. Synth.* , 1998. **32** p. 1–8.
135. Dunn, B.S.E.a., *Applied Multivariate Data Analysis, Second Edition*. 2013.
136. Cohen, Y.C.a.J.Y., *Statistics and Data with R: An applied approach through examples*. 2008.
137. Tukey, J.W., *Comparing individual means in the analysis of variance*. *Biometrics*, 1949. **5**(2): p. 99-114.
138. Ruhaak, L.R., et al., *Optimized workflow for preparation of APTS-labeled N-glycans allowing high-throughput analysis of human plasma glycomes using 48-channel multiplexed CGE-LIF*. *J Proteome Res*, 2010. **9**(12): p. 6655-64.
139. Durie, B.G. and S.E. Salmon, *A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival*. *Cancer*, 1975. **36**(3): p. 842-54.

140. Palmigiano, A., et al., *MALDI-MS profiling of serum O-glycosylation and N-glycosylation in COG5-CDG*. J Mass Spectrom, 2017. **52**(6): p. 372-377.
141. Marques-da-Silva, D., et al., *Cardiac complications of congenital disorders of glycosylation (CDG): a systematic review of the literature*. J Inherit Metab Dis, 2017. **40**(5): p. 657-672.
142. Visser, A., et al., *Acquiring new N-glycosylation sites in variable regions of immunoglobulin genes by somatic hypermutation is a common feature of autoimmune diseases*. Ann Rheum Dis, 2017.
143. van de Bovenkamp, F.S., et al., *The Emerging Importance of IgG Fab Glycosylation in Immunity*. J Immunol, 2016. **196**(4): p. 1435-41.
144. Fokkink, W.J., et al., *Immunoglobulin G Fc N-glycosylation in Guillain-Barre syndrome treated with intravenous immunoglobulin*. Clin Exp Immunol, 2014. **178 Suppl 1**: p. 105-7.
145. Yarwood, A., et al., *Loci associated with N-glycosylation of human IgG are not associated with rheumatoid arthritis: a Mendelian randomisation study*. Ann Rheum Dis, 2016. **75**(1): p. 317-20.
146. Llop, E., et al., *Improvement of Prostate Cancer Diagnosis by Detecting PSA Glycosylation-Specific Changes*. Theranostics, 2016. **6**(8): p. 1190-204.
147. Takahashi, S., et al., *Site-specific and linkage analyses of fucosylated N-glycans on haptoglobin in sera of patients with various types of cancer: possible implication for the differential diagnosis of cancer*. Glycoconj J, 2016. **33**(3): p. 471-82.
148. Saldova, R., et al., *Glycosylation changes on serum glycoproteins in ovarian cancer may contribute to disease pathogenesis*. Dis Markers, 2008. **25**(4-5): p. 219-32.
149. Saldova, R., et al., *Ovarian cancer is associated with changes in glycosylation in both acute-phase proteins and IgG*. Glycobiology, 2007. **17**(12): p. 1344-56.
150. Wang, X., et al., *Differential N-glycan patterns identified in lung adenocarcinoma by N-glycan profiling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections*. J Proteomics, 2018. **172**: p. 1-10.
151. Bartling, B., et al., *Altered desialylated plasma N-glycan profile in patients with non-small cell lung carcinoma*. Cancer Biomark, 2011. **10**(3-4): p. 145-54.
152. Togayachi, A., et al., *Glycobiomarker, Fucosylated Short-Form Secretogranin III Levels Are Increased in Serum of Patients with Small Cell Lung Carcinoma*. J Proteome Res, 2017. **16**(12): p. 4495-4505.

153. Vasseur, J.A., et al., *Smoking and lung cancer-induced changes in N-glycosylation of blood serum proteins*. *Glycobiology*, 2012. **22**(12): p. 1684-708.
154. Hollander, N. and J. Haimovich, *Altered N-Linked Glycosylation in Follicular Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia: Involvement in Pathogenesis and Potential Therapeutic Targeting*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 912.

IX. TÁRGYSZAVAK

myeloma multiplex

N-glikánok

kapilláris elektroforézis lézer indukált fluoreszcens detektálással (CE-LIF)

nagy áteresztő képességű analízis

biotechnológia

fluorofór jelölés

transzfer hidrogénezés

multiple myeloma

N-glycans

capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence (CE-LIF)

high throughput analysis

biopharmaceuticals

fluorophore labeling

transfer hydrogenation

X. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek Prof. Dr. Guttman András tudományos tanácsadónak, a Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratórium igazgatójának munkám során nyújtott szakmai iránymutatásáért és támogatásáért.

Köszönet illeti Dr. Váróczy Lászlót szakmai és gyakorlati tanácsaiért, melyeket a myeloma multiplex kísérleteim kivitelezése során nyújtott.

Köszönettel tartozom a Debreceni Egyetem Fizikai Kémiai Tanszékén dolgozó Dr. Joó Ferencnek, Dr. Horváth Henriettának és Dr. Papp Gábornak, akik a házilag szintetizált $[\text{IrH}_2\text{Cl}(\text{mtpms})_3]$ (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)) komplexeket biztosították a kísérleteim kivitelezéséhez, illetve szakmai tanácsokkal segítették munkámat.

Köszönetemet fejezem ki a Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratórium munkatársainak, akik segítették munkámat.

A doktori értekezésem az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-3-IV-DE-236 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Program és a BIONANO_GINOP-2.3.2-15-2016-00017 projektek támogatásával készült.

Köszönöm a családomnak és barátaimnak a támogatást és a megértést, melyet irányomban tanúsítottak munkám során.

Az értekezésemet férjemnek Simon Ádámnak ajánlom, aki támogatásával és segítségével hozzájárult a dolgozt elkészüléséhez.

XI. FÜGGELÉK



**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

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





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.

