

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Korai differenciáldiagnosztikai markerek  
glikoanalitikai azonosítása kapilláris  
elektroforézissel**

**Farkas Anna**

**Témavezető: Dr. Guttman András**



**DEBRECENI EGYETEM**  
**Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola**  
**Debrecen, 2023.**

# KORAI DIFFERENCIÁLDIAGNOSZTIKAI MARKEREK GLIKOANALITIKAI AZONOSÍTÁSA KAPILLÁRIS ELEKTROFORÉZISSEL

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az **elméleti orvostudományok** tudományágban

Írta: **Farkas Anna** okleveles **molekuláris biológus**

Készült a Debreceni Egyetem **Molekuláris Orvostudomány** doktori iskolája  
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Guttman András, az MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Dr. Tábi Tamás, PhD  
Dr. Türk-Mázló Anett, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus  
tagok: Dr. Tábi Tamás, PhD  
Dr. Türk-Mázló Anett, PhD  
Prof. Dr. Szökő Éva, az MTA doktora  
Dr. Kádas János, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, In Vitro Diagnosztikai Tömb  
előadóterme, 2023. június 16. 11:00 óra

## 1. Bevezetés és Célkitűzések

A több helyszínen zajló tanulmányok növekvő népszerűségével szükségessé válik a nehezebben ellenőrizhető és szabványosítható preanalitikai feltételek egységesítése, illetve a N-glikán tartalmat érintő esetleges hatások értékelése. Mivel az általam vizsgált minták egy részének gyűjtése nem debreceni partnertintézet segítségével valósult meg, így a dolgozat első részében célul tűztem ki a glikán-biomarker kutatás szempontjából annak a kulcsfontosságú kérdésnek a megválaszolását, hogy a vérminták levételétől a centrifugálásig és fagyasztásig eltelt idő befolyásolhatja-e a szérumból minták lézer indukált fluoreszcens detektorral ellátott kapilláris elektroforézis készülék (Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection – CE-LIF) alkalmazásával végzett N-glikomikai analíziseként kapott eredményeket. Az eredmény segíthet a jövőben a különböző vizsgálatok mintagyűjtési protokolljainak megfelelő optimalizálásában és annak eldöntésében, hogy olyan esetekben is levehetőek-e a minták kellő biztonsággal N-glikomikai elemzés céljából, amelyekben a mintavétel és a fagyasztás között huzamosabb idő telik el (például infrastrukturális okok), vagy az idő olyan kritikus tényező, amely olyan mértékű különbségeket okozhat a kapilláris elektroforézissel végzett mérések eredményében, amely hibaforrásként jelenhet meg azok értékelése során.

Ezen előzetes kísérletek eredményeinek ismeretében a dolgozat további részében a terhesség alatti elhízásnak és a terhességi diabetes mellitusnak (GDM) az anyai és gyermek eredetű szérumból izolált IgG, illetve az anyai szérumból izolált IgA antitestekre gyakorolt hatásának vizsgálatával, valamint a krónikus obstruktív tüdőbetegség (Chronic Obstructive Pulmonary Disease – COPD), a tüdőrák és a két tüdőbetegség együttes előfordulásának N-glikomikai tanulmányozásával foglalkozom.

A témaválasztást az indokolja, hogy a hazánkban is népbetegségnek számító COPD az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization – WHO) előrejelzése szerint 2030-ra a harmadik vezető halálozási ok lesz világszerte, míg a tüdőrák a hatodik helyre lép [1], az elhízás pedig olyan krónikus kórállapot, amely szintén a leggyakoribb egészségügyi problémák között szerepel. 2019-ben a WHO adatai szerint az elhízás és annak szövődményei a 9. vezető halálok volt globálisan. A felsorolt kórképek közös mozgatórugója a szisztémás gyulladás (Systemic Chronic Inflammation – SCI), így az azt tükröző IgG és IgA N-glikozilációs mintázatának tanulmányozása értékes biomarkerforrás lehet.

A zsírszövet a legnagyobb endokrin szervként több mint 50 adipokin, kemokin és citokin szekréciójára képes, mellyel befolyásolja az immunrendszer működését [2]. A várandósság ideje alatt az elhízással, illetve a gesztációs diabettessel társuló gyulladás jelentősen befolyásolhatja a placenta állapotát és transzportfolyamatait, ezáltal a magzat fejlődését, valamint születés utáni egészségi állapotát [3]. Az IgG már a magzati élet során az anyaméhben, majd születést követően hozzájárul a gyermek védelméhez mindaddig, amíg annak saját antitestjei megjelennek a keringésben [4]. A molekula N-glikozilációs tulajdonságai befolyásolják annak funkcióját, módosulásai indikátorai lehetnek a szervezetben zajló gyulladásos folyamatoknak [5], melyek az elhízással és gesztációs diabettessel társult terhesség során is fennállhatnak. A főként gyulladásos válaszreakciók mérséklőjeként számon tartott IgA antitestek az anyatejes táplálás révén bekerülve az újszülött szervezetében támogatják az immunrendszer megfelelő működését. Az IgG és IgA N-glikozilációs mintázatának módosulása, ezek tanulmányozása, illetve azonosítása eszköze lehet a terhesség során kialakuló, utódokat is érintő negatív hatások vizsgálatának, valamint azok hatékony kezelésének és megelőzésének.

A kutatás során feltételeztem, hogy az anyai elhízás és a gesztációs diabetes olyan változásokat okoz a placentáris transzportfolyamatok minőségében és a két antitest N-glikozilációjában, amelyek az anyai és utódokból izolált immunglobulinokon egyaránt detektálható így befolyásolva a jövő generációjának születéskori (születési súly, ételérzékenység, C-reaktív fehérje szint) és esetleges későbbi életminőségét, valamint egészségügyi állapotát.

A tüdőrák magas előfordulása a COPD-vel korábban diagnosztizált betegek körében azt sugallja, hogy közös patomechanizmusai lehetnek a két betegségnek, mint például a korai öregedés a tüdőben, genetikai hajlam a betegségre, közös intracelluláris utak aktiválása, növekedési faktorok fokozott expressziója, gyakori légúti megbetegedések vagy epigenetikai tényezők [6]. Mindkét légzőszervi megbetegedés esetében kulcsfontosságú a terápia hatékonysága szempontjából a korai diagnózis felállítása és a személyre szabott terápia mihamarabbi elkezdése.

A PhD munkám során céltom olyan új glikomikai módszer kidolgozása volt, mellyel lehetővé válhat a szérumban IgG és IgA N-glikozilációs mintázatváltozásának egyszerű, gyors és költséghatékony vizsgálata. Céltom volt továbbá szérumban minták N-glikánprofiljának elemzésével a fent említett kórképre jellemző glikobiomarkerek azonosítása. Ez utóbbiak segítségével megjósolhatóvá válhat a COPD kialakulása a különböző rizikócsoportok körében,

valamint lehetővé teheti a már COPD-s betegek esetében az esetleges malignus transzformáció korai stádiumú kimutathatóságát.

Mivel az általam vizsgált kórképek jellemzően szoros előfordulást mutatnak, így munkám során fő célom volt a betegségek differenciáldiagnosztikai jelentőségű glikobiomarkereinek feltárása.

## 2. Anyagok és módszerek

### 2.1. Reagensok

A kísérletekhez felhasznált standard, IgA, haptoglobin (Hp), alfa-1-antitripszin (A1AT) és transferrin (Tf) a Molecular Innovations (Novi, MI, USA) cégtől került beszerzésre míg a standard humán szérum és IgG a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől került megvásárlásra. A standard glikoproteinek mindegyike a forgalmazók adatai szerint  $\geq 95\%$  tisztasággal volt jellemezhető. A fehérjék denaturálásához felhasznált nátrium-dodecilszulfátot (SDS) a VWR (Radnor, PA, USA) cégtől, a fehérjék szolubilizálására használt RIPA lízispuffert (Radio-Immuno-Precipitation Assay) a Merck (Darmstadt, Germany) cégtől vásároltam. A fehérjék aszparagin-kötött glikán struktúráinak enzimatisz felzabadtásához peptid N-glikanáz F (PNGase F) enzimet az Asparia Glycomics (San Sebastián, Spain) cég szolgáltatta. A glikoproteinek felzabadtott glikántartalmának analíziséhez használt Fast Glycan Labeling and Analysis Kitet a SCIEX cégtől (Brea, CA, USA) szereztem be. A Kit tartalmazta a glikán struktúrák fluoreszcens jelöléséhez szükséges 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsavat (APTS), a mintatisztításhoz használt mágneses gyöngyöket, a mérések során standardként alkalmazott maltooligoszacharid létrát és maltózt, valamint az HR-NCHO és NCHO elválasztó puffert. A minták glikánstruktúráinak pontosabb meghatározásához használt kötésspecifikus exoglikozidázok: *Arthrobacter ureafaciens* szialidáz, *Canavalia ensiformis* galaktozidáz és hexóaminidáz a ProZyme (Hayward, CA, USA) cégtől került beszerzésre. Az acetonitril, nátrium-cianoborohidrid (1 M-os, tetrahidrofurános oldat), glicerín, ditiotreitól (DTT), ammónium acetát (AmAc), nátrium-foszfát ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) és imidazol a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől került megvásárlásra. A nátrium-kloridot ( $\text{NaCl}$ ) a MOLAR CHEMICAL Kft-től (Halásztelek, Magyarország) vásároltam. Az IgG szérum mintákból

történő tisztításához alkalmazott Protein G mikoraffinitás oszlopokat és a puffereket, valamint az IgA specifikus kifogásához használt Ni-IMAC oszlopokat a PhyNexus (San Jose, CA, USA) cégtől vásároltuk.

## **2.2. A szobahőmérsékleten történő tárolás N-glikozilációra kifejtett hatását vizsgáló kísérletekhez gyűjtött perifériás vérminták**

A szobahőmérsékleten történő tárolás a szérum N-glikánprofiljára kifejtett hatásának vizsgálatára a klinikumban hagyományosan alkalmazott szérum vérvételi csövet alkalmaztam, a referencia N-glikánprofilú adó mintát az előírásoknak megfelelően kezeltem. Nyolc egészséges fiatal önkéntestől származó vénás vér véralvadás aktivátorral ( $\text{SiO}_2$ ) és szeparátor géllel ellátott Vacutainer vérvételi csőbe került levételre. A vérvételi csöveket a Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA) cégtől szereztem be. A vizsgálatban részt vevő alanyok sorából 3 személy szérum mintáit az előkísérletek során a vizsgálati paraméterek beállításához használtam, míg a kísérletbe bevont valamennyi alany mintáit ( $n=8$ ) poolozást (minták azonos mennyiség összekeverése) követően ismét feldolgoztam és analizáltam kapilláris elektroforézis készülék segítségével.

A kontroll időpont mintáját a vérvétel után 30 percig állni hagytam szobahőmérsékleten ( $24-25^\circ\text{C}$ ), majd  $4^\circ\text{C}$  hőmérsékleten 20 percig ( $2690 \times g$ ) centrifugáltam. Ez az idő szükséges a véralvadási folyamat lejátszódásához, amely átlagosan 60 percről 30 percre gyorsul fel a  $\text{SiO}_2$ -al porlasztással bevont falú vérvételi csövekben. Minden további mintát még azok centrifugálása előtt állni hagytam szobahőmérsékleten a vérvételtől számítva 90; 150 és 270 percig. A levett teljes vérmintákat  $2690 \times g$  alkalmazásával centrifugáltam 20 percig  $4^\circ\text{C}$  hőmérsékletre állítva a centrifuga termosztátját. Az így kapott szérum frakciókat azok egyenlő részekre történő osztását (aliquotálás) követően  $-20^\circ\text{C}$ -on tároltam további felhasználásukig.

## **2.3. Szérum minták előkészítése a mintavételtől a centrifugálásig eltelt idő függvényében bekövetkező N-glikánprofil-változás analízisére**

A 2.2 pontban leírtak szerint kapott szérum minták  $2 \mu\text{L}$ -ét  $10 \mu\text{L}$  térfogatra hígítottam HPLC tisztaságú vízzel, majd glikoprotein tartalmukat  $5 \mu\text{L}$  denaturáló oldat ( $0,375\%$  NP-40;  $12,75\%$  glicerin;  $0,625\%$  SDS és  $12,5 \text{ mM}$  DTT) hozzáadásával hőmérséklet gradienst alkalmazva denaturáltam és redukáltam. A denaturálási lépés során a termosztát hőmérsékletét

5°C/perc fűtési sebességet beállítva 30°C-ról 80°C-ra emeltem [7]. A fehérjék aszparagin aminosavaihoz N-glikozidos kötéssel kapcsolt cukorstruktúráit enzimatis emésztés révén, 1 µL PNGase F (200 mU) és 19 µL HPLC tisztaságú víz hozzáadásával szabadítottam fel a minták egyéni mintaelőkészítése során. A poolozott szérum minták esetében 16,7 mM ammónium-acetát (pH 6,9) puffer oldatot alkalmaztam az N-glikánok enzimatis felszabadításakor. A mintákat 50°C-on 1 órán keresztül inkubáltam, majd 1 percig jégre helyezve hűtöttem, fehérje tartalmukat 70 µL jéghideg acetonitril hozzáadásával kicsaptam. Ezt követően a kapott precipitátumot és felülúszót, amely a felszabadított N-glikánokat tartalmazta, centrifugálással szétválasztottam (11 290 x g, 10 perc) egymástól. A felülúszót vákuum centrifuga (SpeedVac, Thermo Scientific, Schaumburg, IL, USA) segítségével beszáritottam, a cukorkomponenseket a 2.7 pontban bemutatott fluoreszcens jelölőoldattal jelöltem egy éjszakán át 37°C-on nyitott kupak mellett, beszáradásig [8]. A mágneses gyöngyökkel történő tisztítási lépést követően a mintákat a 2.7 pontban leírtak szerint kezeltem.

#### **2.4. Anyai és gyerek szérum minták IgG és IgA glikozilációs analízise**

Az N-glikozilációs analízisre szánt mintákat a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika munkatársai bocsátották a rendelkezésemre, a minták gyűjtése a 172/2018-SZTE számú etikai engedélynek megfelelően történt. A résztvevők toborzása során a kutatásból történő kizáró okként határoztuk meg azokat a tényezőket, amelyek a túlsúlyon/elhízáson kívül fokozott kockázatot jelentenek a GDM kialakulására illetve azokat, amelyek befolyásolhatják az N-glikánprofil. A kutatás során tejminták gyűjtésére is sor került a szérum mellett, és azokból nemcsak glikozilációs, hanem zsírsav analízis is történt a Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem munkatársainak közreműködésével, így a mintavételi kritériumok összehangolását követően kizártuk az alanyokat a kutatásból ha:

- 1) az anya I. típusú diabétesz mellituzsban szenvedett vagy
- 2) az anya valamilyen különleges étrendet követett
- 3) az anya és/vagy gyermek esetében genetikai rendellenességre derült fény
- 4) ikerterhesség és
- 5) császármetszéssel történő szülés [9]

A vérminták a szülést követő 12. héten kerültek levételre. A vizsgálati csoportok kialakítása során az anyai BMI értéket, valamint a GDM meglétét vettük figyelembe.  $BMI \geq 30$  esetén az alanyok az elhízott, míg  $BMI \leq 30$  érték esetén a normál testsúlyú csoportokba kerültek. Ennek megfelelően a következő csoportokat alakítottam ki:

- 1) Normál testsúlyú anya gesztációs diabétesz mellitusz nélkül – HNW (Healthy Normal Weight)
- 2) Elhízott anya gesztációs diabétesz mellitusz nélkül – HOB (Healthy Obese)
- 3) Normál testsúlyú anya gesztációs diabétesz mellituszsal – NWGDM (Normal Weight with Gestational Diabetes Mellitus)
- 4) Elhízott anya gesztációs diabétesz mellituszsal – OGDM (Obese with Gestational Diabetes Mellitus)

Minden csoport N-glikozilációs analízise előtt 15-15 minta került poolozásra az anyák és gyermekek esetében egyaránt. A csoportok anyáitól származó szérum mintákból affinitás kromatográfiával tisztítottam az IgG és az IgA, a gyermekek szérum mintáiból pedig az IgG antitesteket.

## **2.5. Szérum minták előkészítése IgG és IgA N-glikozilációs analízisre**

Az IgG mintákból történő specifikus kifogásához 40  $\mu$ L térfogatú Protein G, az IgA kifogásához 40  $\mu$ L térfogatú Ni-IMAC (Nickel Immobilized Metal Affinity Chromatography) kromatográfiás mikrooszlopokat (PhyNexus, San Jose, CA, USA) alkalmaztam. A félig automatizált IgG és IgA kifogási lépést a PhyNexus Inc. által a rendelkezésemre bocsátott PumpControl 2 szoftver és az általa vezérelt, szintén a cégtől kapott E4 XLS+ típusú elektronikus pipettával végeztem. A fehérje tisztítási lépéseket IgG esetében Mesko és mtsai. [10] által publikált eljárásnak a rendelkezésre álló mintamennyiségre történő optimalizálásával valósítottam meg.

IgA szérum mintából történő tisztításához Mészáros és mtsai. [11] által kidolgozott eljárást alkalmaztam annak módosítását követően. Az IgA specifikus megkötéséhez szükséges N-terminálisan 10 His-Tag-et tartalmazó Z(IgA1) affibody molekulákat a Pannon Egyetem Bio - nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet munkatársaitól kaptam további felhasználásra.

### 2.5.1. IgG tisztítása

#### Alkalmazott pufferek:

- 1) 5 x töménységű Felkötő/Mosó puffer I. (Puffer A): 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,7 M NaCl (pH 7,4)
- 2) Mosó puffer II. (Puffer P): 140 mM NaCl
- 3) Eluáló puffer: frissen készített 10% ecetsav (pH 2,5)

Az IgG szelektív kifogása során használt Felkötő/ Mosó puffer I. (Puffer A), valamint a Mosó puffer II. (Puffer P) oldatok a PhyNexus által forgalmazott „Box of 96 PhyTip® columns (1 ml volume) containing 40 µl of Protein A affinity resin per column” csomag részét képezték.

#### A minták előkészítése a következők szerint történt:

A szérum minták 220 µL térfogatához azonos mennyiségű 1x töménységre hígított Puffer A Felkötő/Mosó puffert adtam, majd a minták és a puffer keverékéből alapos vortexelést követően 400 µL került felvitelre az oszlopokra hegyenként azok 200 µL Puffer A oldattal történő előkészítése után. Az IgG felkötését követően 200 µL Puffer P pufferrel mostam a tölteteket, majd a felkötött antitesteket frissen készített 200 µL 10 % ecetsavval mostam le.

Mivel az eluáló puffer erősen savas kémhatású, így töltetekről leoldott mintákat puffercserre és térfogatcsökkentés céljából 10 kDa centrifugális szűrőt tartalmazó mikrocentrifuga csőbe vittem át. Az ecetsavat 11 384 x g-vel 10 percig történő centrifugálással távolítottam el. Az esetlegesen a szűrőn maradó ecetsav eltávolítása érdekében 50 µL HPLC tisztaságú vizet adtam a szűrőhöz, majd 11 384 x g-vel ismét centrifugáltam azokat 10 percig. A fehérjék denaturálását a szűrő felületén végeztem 10 µL víz és 4 µL denaturáló oldat (400 mM DTT, 5% SDS) hozzáadásával (80°C; 10 perc). A termosztátban történő párolgás elkerülése érdekében az inkubálások során a mikrocentrifuga csövek tetejét minden esetben parafilmmel vontam be. A denaturáló oldat centrifugálással történő eltávolítása után mostam a szűrő felületét 30 µL vízzel 11 384 x g-t alkalmazva 10 percig. A 10 kDa szűrőt áthelyeztem tiszta mikrocentrifuga csőbe, majd a felületén lévő denaturált és redukált fehérjék N-glikán tartalmát 49 µL 20 mM  $\text{NaHCO}_3$  (pH 7,0) és 1 µL PNGase F enzimet (200 mU) alkalmazva 37°C-on egy éjszakán át (overnight) történő inkubálással szabadítottam fel.

A felszabadított N-glikánokat lemostam a szűrőről 30 µL HPLC tisztaságú vízzel és 11 384 x g-vel 10 percig történő centrifugálással, majd vákuum centrifuga (Thermo Scientific,

Schaumburg, IL, USA) alkalmazásával beszárítottam a szénhidrátot tartalmazó átfolyót. A bepárolt N-glikánokat 6  $\mu\text{L}$  20 mM 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsav (APTS) (15% ecetsavban feloldva) és 2  $\mu\text{L}$  1 M nátrium-cianoborohidrid ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) oldat (tetrahydrofuranban oldva) elegyével jelöltem meg 37°C-on 1 éjszakán át történő inkubálással. A jelölést követően a mintákat a kapilláris elektroforézissel történő analízisig a 2.7 pontban leírtak szerint kezeltem.

## 2.5.2. IgA tisztítása

### Alkalmazott pufferek:

- 1) Z(IgA1) kötő puffer (Puffer A): 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 50 mM NaCl (pH 7,4)
- 2) IgA kötő és mosó puffer (Puffer B): 50 mM imidazol, 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl (pH 7,4)
- 3) Eluáló puffer (Puffer C): 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 50 mM NaCl, 500 mM imidazol (pH 2,5)

Szérum minták 100  $\mu\text{L}$  térfogatához 900  $\mu\text{L}$  Puffer B IgA kötő és mosó puffert adtam. Az oszlopokat 400  $\mu\text{L}$  Puffer A oldattal előzetesen kondicionáltam, majd funkcionáltam Puffer A oldatban oldott 1 mL végtérfogatú 1 mg/mL végkoncentrációjú 10 His-tag Z(IgA1) oszlophoz történő immobilizálásával. Az affibody felkötését követően kétszer mostam a tölteteket 400  $\mu\text{L}$  Puffer B oldattal. Az IgA Z(IgA1) affibody-hoz történő kikötése után ismét mostam a nem specifikusan kötődött molekulák eltávolítása érdekében a mikrooszlopokat kétszer 500  $\mu\text{L}$  Puffer B oldattal, majd eluáltam az oszlopról a Z(IgA1) – IgA komplexet 200  $\mu\text{L}$  Puffer C alkalmazásával. A mintákat a továbbiakban a 2.5.1 pontban leírt mintaelőkészítési lépések szerint kezeltem.

## **2.6. A tüdőrák és a COPD közötti N-glikozilációs eltérés analízise céljából gyűjtött minták**

A kontroll, tüdőrákban, COPD-ben, valamint a két betegségben együttesen szenvedő (komorbid), vizsgálatba bevont alanyok szérum mintái közül vizsgálati csoportonként 100-100 darab került kiválasztásra, melyek csoportonként pooloztam. Az egyes csoportokon belül a nemek aránya és a csoportok átlagéletkora a következők szerint alakult: 1) Kontroll 61% férfi és 39% nő ( $56,04 \pm 14,46$  átlagéletkor), 2) COPD 52% férfi és 48% nő ( $66,20 \pm 9,68$  átlagéletkor), 3) tüdőrák 64% férfi és 34% nő ( $64,42 \pm 9,05$  átlagéletkor), 4) Komorbid (COPD és tüdőrák) 72% férfi és 28% nő ( $65,19 \pm 8,38$  átlagéletkor). A minták gyűjtése a 23580-1/2015/EKU (0180/15) számon nyilván tartott etikai engedélyben foglaltaknak megfelelően a miskolci Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Központi Kórház és Egyetemi Oktatókórház, Semmelweis Tagkórház Tüdőgyógyászati Osztályának munkatársai segítségével valósult meg. A vizsgálatból kizártam azokat a pácienseket, akik egyéb tüdőbetegségben szenvedtek és azokat, akik esetében a tüdőrák, mint áttét jelentkezett. Kizártam továbbá a különböző autoimmun megbetegedéssel diagnosztizált pácienseket és a kábítószer-függő alanyokat.

## **2.7. A szérum és standard glikoprotein minták előkészítése N-glikozilációs eltérések vizsgálatára**

A fehérje standardok felhasználásával 10 mg/mL törzsoldatokat készítettem, melyekből a fehérjék méréseihez 10 -10  $\mu$ L térfogatot használtam fel. A humán szérum N-glikozilációs profiljának modellezésére megalkotott standard fehérje-keverék (Standard Protein Mixture – SPM) létrehozásához felhasznált minden glikoprotein oldat kiindulási koncentrációja 10 mg/mL volt az IgG kivételével, amely törzsoldata 50 mg/mL koncentrációban tartalmazta a fehérjét. Az SPM a standard fehérjéket az alábbi célkoncentrációkban tartalmazta:

- 1) Haptoglobin (Hp) – 2,0 mg/mL (0,3-2,0 mg/mL)
- 2) Transzferrin (Tf) – 3,0 mg/mL (2,0-3,6 mg/mL)
- 3) Alfa-1-antitripszin (A1AT) – 1,0 mg/mL (0,9-2,0 mg/mL)
- 4) IgA – 2,1 mg/mL (0,7-4,0 mg/mL)
- 5) IgG – 7 mg/mL (7-16 mg/mL)

A célkoncentrációk mögött zárójelben a fehérjék fiziológiás szérum koncentrációtartományait tüntettem fel [12].

Az egyes glikoproteinek végső koncentrációját a standard fehérje-keverékben kísérleti úton határoztam meg, mely során a fehérjék koncentrációját a keveréken belül mindaddig módosítottam, amíg annak N-glikánprofilja hasonlóvá nem vált az emberi szérum N-glikozilációs mintázatához. Az alkalmazott glikoproteinek tisztaságát azok glikozilációs analízise előtt SDS-PAGE gélelektroforézis segítségével ellenőriztem, melyhez 10-20% Tris-Glicin előöntött géleket (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) használtam a gyártó utasításainak megfelelően.

A szérum minták vizsgálatához minden esetben 2  $\mu$ L szérumot 8  $\mu$ L HPLC tisztaságú víz hozzáadásával hígítottam, fehérjetartalmukat 65°C-on 10 percig denaturáltam és redukáltam 5  $\mu$ L előre elkészített denaturáló oldat hozzáadásával [60  $\mu$ L 1x töménységűre hígított RIPA puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,25% nátrium-deoxikolat; 1% NP-40 és 1 mM EDTA), 10  $\mu$ L 5% SDS és 10  $\mu$ L 100 mM DTT]. A fehérjék N-kötött cukorstruktúráit enzimatis emésztéssel, 1  $\mu$ L PNGase F (200 mU) enzim és 50  $\mu$ L víz hozzáadásával szabadítottam fel. A komplex N-glikán struktúrák hőmérséklet és pH-érzékeny  $\alpha$ (2-3,6,8,9) kötött szialsav egységeinek eltávolítása céljából a reakcióelegyhez 1  $\mu$ L *Arthrobacter ureafaciens* szialidáz (1 U) enzimet is adtam, majd a mintákat az enzimekkel 50°C-on 1 órán át inkubáltam. A mintákat ezt követően jégre helyezve 1 percig hűtöttem, majd fehérjeit 120  $\mu$ L jéghideg acetonitril hozzáadásával kicsaptam. A kicsapott fehérjét a cukor komponensektől 11 290 x g centrifugális erő alkalmazásával választottam el. A centrifugálást 5 percig végeztem. A vizsgálni kívánt N-glikánokat tartalmazó felülúszót ezt követően vákuumcentrifuga segítségével beszárítottam, majd fluoreszcens jelölőoldat hozzáadásával [4  $\mu$ L 40 mM APTS (20% ecetsavban oldva), 2  $\mu$ L NaBH<sub>3</sub>CN (1 M tetrahidrofuranban oldva) és 4  $\mu$ L 20% ecetsav] megjelöltem. A jelölési lépést 50°C-on 1 órán keresztül zárt kupakkal, majd a mintatartók kupakjainak felnyitását követően további 1 órán át 55°C-on [8] beszáradásig végeztem. A jelölt mintákat ezt követően mágneses gyöngyök alkalmazásával tisztítottam meg a feleslegben alkalmazott fluorofór jelölő ágenstől. Ezen tisztítási lépés során a mintákhoz acetonitril került hozzáadásra annak érdekében, hogy az oldatban a 87,5% acetonitril koncentrációt elérjem, mely végkoncentráció a cukrok mágneses gyöngyökhöz történő kötődésének ideális koncentrációja [13]. A glikánokat a gyöngyökről HPLC tisztaságú vízzel

eluáltam, majd vagy azonnal kapilláris elektroforézissel analizáltam, vagy későbbi mérés céljából -20°C-on tároltam.

## **2.8. A kapilláris elektroforézis készülék**

A kapilláris elektroforetikus mérések kivitelezéséhez lézer indukált fluoreszcens detektorral ellátott PA800 Plus Pharmaceutical Analysis System (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) készüléket használtam. A detektáláshoz a mintákban lévő APTS festéket Ar-ion lézer által kibocsátott 488 nm hullámhosszúságú fénnel gerjesztettem, a festék által emittált fényt emissziós filter segítségével (520 nm) gyűjtöttem. Az elválasztások során 50 cm effektív hosszúságú (60 cm teljes hosszúságú), 50 µm belső átmérőjű nem bevont falú úgynevezett BFS (Bare Fused Silica) kapillárist használtam. A kapillárisokat HR-NCHO (pH 4,75) vagy NCHO (pH 4,75) elválasztó gél pufferekkel töltöttem fel, melyekbe a mintát HR-NCHO gél esetén elektrokinetikusan, NCHO gél esetén pedig nyomás alkalmazásával injektáltam. A készüléket az elválasztások során fordított polaritás üzemmódban (katód az injektálási oldalon, anód a detektálási oldalon) használtam. A mérések során alkalmazott elválasztási körülmények minden esetben feltüntetésre kerültek az elektroferogramok alatt.

## **2.9. Adatok kiértékelése**

Az adatok gyűjtésére és feldolgozására a 32Karat (10.1 verzió) szoftvercsomagot (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) használtam. A mérések eredményeiként kapott elektroferogramok csúcsai a glükóz egység (GU) értékeik alapján hozzárendelhetők az egyes glikán struktúrákhoz. A GU értékek kiszámítását a GUcal szoftverrel végeztem ([www.gucal.hu](http://www.gucal.hu)) [14]. Az N-glikán struktúrák csúcsokhoz rendelését a szoftver beépített adatbázisának felhasználásával, irodalmi adatok alapján és külső adatbázisban történő keresés révén végeztem ([www.glycostore.org](http://www.glycostore.org)). A vizsgált minták N-glikán tartalmának azonosítása során az elektroferogramok azon csúcsait tekintettem cukor struktúrának, amelyek átlagos relatív csúcsalatti területszázaléka elérte a minimum 1% (területszázalék  $\geq 1\%$ ) értéket. Az elválasztott komponensek normalizált csúcsalatti területének százalékos értékeit a PeakFit v4.12 szoftverrel (SeaSolve Software Inc., San Jose, CA, USA) számoltam ki.

## 2.10. Statisztikai elemzés

Az eredmények elemzése során a PeakFit szoftver alkalmazásával kapott adatok átlagértékeit és azok standard hibáit határoztam meg, melyek átlag  $\pm$  SD-ként vannak feltüntetve. Statisztikai analízist GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA; 8.0.1 verzió) szoftverrel végeztem.

Az adatok eloszlásának vizsgálatához minden esetben Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztam.

A szobahőmérsékleten eltelt időnek a minta N-glikán kompozíciójára kifejtett hatásának vizsgálata során mivel nem minden csúcs mutatott normál eloszlást, Friedman próbát alkalmaztam [15] Dunn *post hoc* tesztjével kiegészítve [16]. A minták N-glikán szerkezeteinek szíálsav/neutrális arányának alakulását Friedman próbával és Dunn tesztjével vizsgáltam. A poolozott minták esetében a 150 percig tárolt minta szíálsav/neutrális szerkezeteinek elemzésekor tapasztalt szórásnövekedés miatt ROUT aoutlier analízist végeztem (Q=1%).

Az anyai és gyermek szérum IgG és IgA immunglobulinok N-glikozilációs analízise során Kruskal-Wallis tesztet végeztem, mely után a csoportok közti eltérés vizsgálatára Dunn tesztjét alkalmaztam. A minták N-glikán szerkezeteinek szíálsav/neutrális arányának alakulását az adatok normál eloszlása esetén egyszempontos variancianalízissel (One way ANOVA) és Tukey teszttel, ellenkező esetben Dunn tesztjével vizsgáltam.

A kontroll, COPD, tüdőrák és a két betegség együttes előfordulásában szenvedő betegektől származó minták esetében Kruskal-Wallis tesztet végeztem, mivel a poolozás következtében kialakult redukált mintaszám miatt a normális eloszlás biztonsággal nem határozható meg. A vizsgálati csoportok közötti eltérés meghatározásához Dunn tesztjét alkalmaztam *post hoc* analízisként [17].

A statisztikai elemzés során a különbségeket  $p \leq 0,05$  érték esetén tekintettem szignifikánsak, melyet az ábrákon \* jelöl az alábbiak szerint: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

## 3. Eredmények

### 3.1. Humán szérum N-glikánprofil változása szobahőmérsékleten történő tárolás során (24-25°C)

A szérum minták egyéni (n=3) glikozilációs analízise során 13 fő (legalább 1% területszázalékot elérő) N-kapcsolt glikán szerkezetet azonosítottam. Mivel a szíálsavak

számos biológiai folyamatban szerepet játszanak, így főként a szialsavas struktúrák arányának alakulása volt az érdeklődésem középpontjában, ezért ezen struktúráknak (SF - sialoform) a neutrális szerkezetekhez (NF – neutral form) való viszonyát értékeltem (SF/NF ratio). A szialsavas struktúrák arányának alakulása (SF/NF ratio) szempontjából azt tapasztaltam, hogy az idő előrehaladtával a szialilált szerkezetek aránya ugyan kismértékű, de folyamatosan csökkenő tendenciát mutatott, mely a 270 perces minta esetében mérséklődött. A SF/NF arányok alakulását statisztikai elemzésnek alávetve azonban nem tapasztaltam szignifikáns eltérést a csoportok között. Az esetleges egyéni eltérések figyelembevétele céljából 8 egészséges önkéntes szérumból mintájának poolozásával kapott N-glikánprofil alakulását tanulmányoztam. A kísérletek során ammónium-acetát (16,7 mM, pH 6,9) oldatot alkalmaztam az N-glikánok fehérjékről történő enzimatisz fel szabadítása során pufferként, méréseimet a nagyobb felbontást biztosító HR-NCHO elválasztó pufferben végeztem. A mérési adatok kiértékelése során 16 N-glikán szerkezetet azonosítottam. Az SF/NF arány vizsgálata során a poolozott minták esetében szintén csökkenést figyeltem meg a kontrollhoz képest a 90 ( $3,35 \pm 0,46$ ) és 270 perces ( $3,07 \pm 0,18$ ) minták szialsav tartalmában, azonban a 150 percig ( $7,48 \pm 2,02$ ) tárolt szérumból minták esetében a kontrollt ( $3,73 \pm 0,33$ ) is meghaladó SF/NF arány növekedést tapasztaltam. A növekedés mértéke azonban nem volt statisztikai szempontból szignifikáns a kontrollhoz viszonyítva ( $p=0,1708$ ), szemben a 90 perces ( $p=0,0115$ ) és a 270 perces ( $p<0,0001$ ) mintákkal. Az SF/NF arány azonban nem mutatott szignifikáns eltérést sem a kontroll és 90 perces ( $p>0,9999$ ), sem a kontroll és a 270 perces ( $p=0,1057$ ), sem pedig a 90 és 270 perces ( $p=0,8648$ ) minták esetében.

A poolozott minták N-glikán szerkezeteinek Friedman és Dunn tesztekkel végzett statisztikai elemzése során a 16 azonosított csúcsból 6 esetben tapasztaltam statisztikailag szignifikáns eltérést, azonban ezek az eltérések egyike sem a kontroll időpont és valamelyik egyéb vizsgált időpont között fordult elő. A szignifikáns változások minden esetben a kontrolltól eltérő időpontok között voltak megfigyelhetők.

### **3.2. Az anyai elhízás és a gesztációs diabétesz hatása**

#### **3.2.1. Anyai és gyermek szérumból izolált IgG N-glikozilációjának összehasonlítása**

A PhD munkám második szakaszában az anya és gyermek szérumból Protein G affinitás kromatográfiás mikrooszlopok alkalmazásával tisztított IgG antitestek N-glikoziláció

módosulásait tanulmányoztam, mely során meghatároztam az anyai és a gyermek szérumban lévő IgG antitestek N-glikán struktúráit.

A egészséges normál testsúlyú (kontroll) édesanyák csoportjából izolált IgG antitestek N-glikozilációjának vizsgálata során 14 olyan szerkezetet sikerült azonosítanom, amelyek megfeleltek az általam korábban meghatározott és fent leírt kritériumnak (átlagos relatív területszázalék  $\geq 1\%$ ). Ugyazén feltételnek a gyermekek szérumban lévő mintáinak IgG-eredetű N-glikánprofilját vizsgálva 13 csúcs felelt meg. A szíalsavas-neutrális szerkezetek arányának Kruskal-Wallis és Dunn *post hoc* analízissel végzett összehasonlítása során az egészséges, normál testsúlyú anyák és gyermekeik (HNW anyák SF/NF=0,33  $\pm$  0,01; HNW anyák gyermeke SF/NF=0,30  $\pm$  0,03; p=0,026); valamint az egészséges, de túlsúllyal küzdő anyák és gyermekeik között (HOB anyák SF/NF=0,29  $\pm$  0,02; HOB anyák gyermekei SF/NF=0,34  $\pm$  0,02; p=0,0087) találtam statisztikailag szignifikáns eltérést.

### **3.2.2. Anyai elhízással és gesztációs diabéteszrel szövődött terhesség hatása az anyai szérumból izolált IgG N-glikozilációjára**

Az SF/NF arány Kruskal-Wallis teszttel végzett statisztikai elemzése során csak a HOB és NWGDM csoportok között tapasztaltam csekély mértékű, de szignifikáns eltérést (p=0,0197). Az elemzés során a HNW csoport nem mutatott szignifikáns eltérést sem a HOB (p=0,2699), sem az NWGDM (p>0,9999), sem pedig az OGDM (p>0,9999) csoportok között. Emellett nem volt szignifikáns különbség az OGDM és HOB (p=0,2727), sem pedig az OGDM és NWGDM (p>0,9999) vonatkozásában sem. A szíalsavval terminált szerkezetek arányának vizsgálata mellett az egyes csúcsokhoz tartozó relatív területszázalék adatokat statisztikai elemzésnek vettem alá. Az adatok elemzésére Kruskal-Wallis tesztet, majd Dunn *post hoc* analízist alkalmaztam, melynek eredményeként a 14 azonosított anyai N-glikán szerkezet közül 3 kivételével (5., 7. és 11. csúcsok) valamennyi struktúra szignifikáns eltérést mutatott az egyes csoportok között. A 11 szerkezetből, melyek szignifikáns eltérést mutattak valamely vizsgált csoport között, 10 tért el a kontroll és bármely csoport között. Ebből 4 alapján tudtam elkülöníteni egymástól a kontroll és a HOB (A2G2S2, p=0,0003; FA2G2S2, p=0,0006; FA2BG2S2, p=0,0238; FA2 [6]G1, p=0,0133), 2 alapján a kontroll és az NWGDM (FA2B, p=0,0003; FA2B [6]G1, p=0,0098) és 7 szerkezet alapján a kontroll és az OGDM (A2G2S2, p=0,0314; FA2G2S2, p=0,0291; FA2BG2S2, p=0,014; FA2(3)G1S1, p=0,0193; FA2G2S1, p=0,0088; FA2G2, p=0,0002; FA2BG2, p=0,003) csoportokat.

### **3.2.3. Anyai elhízás és gesztációs diabétesz hatása az utódok szérumból származó IgG N-glikozilációjára**

A vizsgálati csoportok édesanyáitól született gyermekek véréből izolált IgG N-glikozilációs vizsgálata során 13 olyan csúcsot azonosítottam, melyek relatív területszázalék értéke elérte a legalább 1% értéket. A sziaálsavas szerkezetek aránya Kruskal-Wallis és Dunn *post hoc* analízis eredményeként szignifikánsan magasabbnak bizonyult a HOB anyáktól született gyermekek csoportjában a kontroll ( $p=0,0423$ ) és az OGDM anyák gyermekeihez viszonyítva ( $p=0,0225$ ) is. A két GMD meglétével diagnosztizált anyai csoport gyermekei között szintén jelentős eltérést tapasztaltam, az OGDM gyermekek szignifikánsan alacsonyabb szialilációs fokkal jellemezhetők a normál testsúlyú terhességi cukorbeteg anyák gyermekeihez képest ( $p=0,033$ ). A HNW és NWGD ( $p=0,0607$ ), valamint HNW és OGDM ( $p>0,9999$ ) csoportok között nem volt szignifikáns eltérés, ahogyan a HOB és NWGD ( $p>0,9999$ ) csoportok között sem. A vizsgált csoportok édesanyáitól született gyermekek esetében azonosított 13 komplex N-kapcsolt cukorstruktúra közül 9 (FA2G2S2; FA2(3)G1S1; A2G2S1; FA2; FA2[6]G1; FA2[3]G1; FA2B[6]G1; FA2G2 és FA2BG2) relatív területszázalék megoszlásában tapasztaltam statisztikai szempontból is szignifikáns eltérést a csoportok között. Ebből a 9 struktúrából 3 alapján tudtam a kontroll csoportot az HOB (FA2(3)G1S1,  $p=0,0076$ ; FA2[6]G1,  $p=0,0151$ ; FA2B[6]G1,  $p=0,033$ ) csoporttól, és 4 alapján az NWGD (FA2G2S2,  $p=0,0115$ ; A2G2S1,  $p=0,0225$ ; FA2[6]G1,  $p=0,0003$ ; FA2[3]G1,  $p=0,0197$ ) anyáktól született gyermekek csoportjaitól elkülöníteni.

### **3.2.4. Anyai elhízás és a gesztációs diabétesz hatása az anyai szérumból származó IgA N-glikozilációjára**

Az anyai szérumból izolált IgA antitestek N-glikomikai elemzése során 19 olyan csúcsot tudtam azonosítani, amelyek relatív területszázalék értéke elérte a legalább 1%-ot. Ezekhez a csúcsokhoz a GU értékeik, valamint adatbázisban történő keresés és irodalmi adatok alapján rendeltem hozzá a 20 N-glikán struktúrát (a 9-es és 10-es struktúrák komigráltak). Az azonosított N-glikán szerkezetek jelentős része, a 20 struktúra közül 15 statisztikai szempontból szignifikáns eltérést mutatott legalább két összehasonlított csoport között. A vártakkal ellentétben azonban az elhízott anyák csoportjának IgA N-glikozilációja a kontroll csoporttól csak egyetlen N-glikán szerkezet alapján volt elkülöníthető (A2[3]G1S1,  $p=0,0042$ ), szemben az IgG antitestekkel, ahol a kontroll és az elhízott csoport 4 szerkezete is eltérést

mutatott. A kontroll és a normál testsúly ellenére is GDM meglétével diagnosztizált csoport összehasonlításakor 3 szerkezet (FA1[6]+A2BG2S1,  $p=0,0291$ ; A1G1[6],  $p=0,0423$ ), míg a kontroll és az elhízott terhességi cukorbetegséggel diagnosztizált anyák csoportjainak összehasonlítása során 7 struktúra (FA2BG2S2,  $p=0,0291$ ; A[3],  $p=0,0132$ ; M5,  $p=0,0027$ ; A1G1[6],  $p=0,0006$ ; FA1[3]G1,  $p=0,0225$ ; A2G2,  $p=0,0197$  és FA2G2,  $p=0,0065$ ) tért el szignifikánsan. Meg kell azonban említeni, hogy a kontroll és az elhízott gesztációs diabéteszes anyák csoportja közötti szignifikáns eltérést mutató csúcsok jelentős része kisebb területszázalékú csúcs, átlagos értékük nem haladja meg a 4%-ot. Ezért a kontroll csoporttól az ODGM csoportot biztonsággal az FA2BG2S2, az A[3], valamint az A2G1[6] szerkezetek alapján lehet elkülöníteni, melyek közül kiemelkedik a monogalaktozilált szerkezet. A gyulladásos folyamatokat jelző szialiláció alakulásának tekintetében azonban nem tapasztaltam szignifikáns eltérést a csoportok között.

### **3.3. COPD és tüdőrák N-glikomikai analízise teljes emberi vérszérumból**

#### **3.3.1. Standard humán szérum és a szérumban nagy koncentrációban jelen lévő standard fehérjék keverékének összehasonlítása**

A különböző szövet- és sejttípusok eltérő fehérje glikoformákat expresszálhatnak fiziológiás és patológiás körülmények között, melyek a keringésbe kerülve diagnosztikai jelentőségűek lehetnek. A tumordiagnosztika területén az ilyen glikoproteinek igen vonzó biomarker célpontnak tűnhetnek specificitásuk miatt annak ellenére, hogy ezen fehérjék várhatóan a  $\mu\text{g/mL}$  koncentrációtartományban lesznek fellelhetők a keringésben [18], ezért a kellően érzékeny módszerek kidolgozására nagy hangsúlyt kell fektetni, melyek mind az idő, mind az anyag, mind pedig a mintaigényt nagymértékben növelhetik. Bár a szérumban nagy koncentrációban előforduló fehérjék depletálásával nagyobb eséllyel tárhatnánk fel a kis koncentrációjú, potenciális biomarkereket, számos tanulmány számol be arról, hogy az ismert szérumkomponensek és az akut fázis fehérjék szintén hordozhatnak diagnosztikai szempontból releváns információt [19], nem beszélve a teljes szérum/plazma analíziséről [20]. A különböző fehérjéknek a szérumból N-glikozilációs analízis céljára történő specifikus tisztítása ráadásul jelentős idő- és költségigényes eljárásokkal valósítható meg, melyek mintaigénye a szérum közvetlen analíziséhez viszonyítva is nagy. Ennek kiküszöbölése érdekében kidolgoztam egy új potenciális módszert, mely segítségével a szérum minta egészének vizsgálatával nyerhetünk

kellő információt a szérumban legnagyobb mennyiségben jelen lévő két antitest (IgG és IgA), valamint további három glikoprotein (Hp, Tf és A1AT) N-glikozilációs módosulásairól. A szérumban nagy koncentrációban jelen lévő öt fehérje fiziológias koncentrációtartományon belüli összekeverésével megalkotott deszialilált modell szérum (Standard Protein Mixture – SPM) és a kereskedelmi forgalomban kapható standard humán szérum deszialilálást követő glikomikai elemzése során mindkét mintatípus esetén megegyező, 9-9 fő (átlagos relatív területszázalék  $\geq 1\%$ ) N-kapcsolt glikán szerkezetet azonosítottam. Az analízis alapján elmondható, hogy az 1–4-es csúcsok (FA2, FA2B, FA2(6)G1, FA2(3)G1) az IgG-ről származnak, míg az 5-ös (A2G2) és a 6-os (FA2G2) csúcsok mind az öt tanulmányozott fehérjén megtalálhatók. A 7-es (FA2BG2) csúcs az IgG-ről és az IgA-ról egyaránt eredeztethető, míg a három antennával rendelkező struktúrák, azaz a 8. (A3G3) és a 9. csúcsok (FA3G3) forrása feltehetően a haptoglobin fehérje. Meg kell jegyezni azonban, hogy az SPM-hez választott öt fehérje az emberi szérum glikozilált fehérjeinek kb. 85%-ának felel meg, ezért első közelítésként úgy ítélt meg, hogy a megfigyelt kisebb különbségeket az alacsonyabb koncentrációjú szérum glikoproteinek (low abundant proteins) fennmaradó ~15%-a okozhatta [21]. Tüdőrák, COPD és komorbid betegcsoportok N-glikozilációs analízise és statisztikai elemzése

A betegcsoportok vizsgálata során a standard szérumhoz, valamint az SPM mintához hasonlóan 9 fő ( $\geq 1\%$  csúcs alatti terület) N-glikán struktúrát sikerült azonosítanom a minták glikánprofiljának stabilitását növelő deszialilálási lépést követően a csúcsokhoz tartozó GU értékek alapján. A szérum glikoproteinek N-glikozilációjában a struktúrák részletes vizsgálata során a kontrollhoz képest növekedést figyeltek meg korábban azok elágazásának mértékét Branching Degree – BD) illetően patológiás körülmények között [22]. Mivel az elágazás mértékének meghatározása szíálsavak nélkül is diagnosztikus jelentőséggel bírhat, ezért a szérum minták deszialilált N-glikán szerkezeteinek relatív százalékos eloszlásának felhasználásával meghatároztam a kontroll, COPD, tüdőrák, valamint a komorbid csoportok mintáiban az antennáris elágazás mértékét az alábbiak szerint:

**Antennáris elágazás mértéke = Háromantennás glikán struktúra (%) / Összes glikán struktúra (%)**

Az antennáris elágazás mértékének vizsgálata során valamennyi vizsgált betegcsoportban növekedést tapasztaltam a kontroll csoporthoz viszonyítva. A COPD betegek körében a háromantennás szerkezetek aránya (0,07) bár jelentős, de statisztikailag nem mutatott

szignifikáns növekedést a kontroll (0,04) csoporttal ( $p=0,2492$ ), valamint a komorbid csoport 0,05 ( $p>0,9999$ ) értékével összehasonlítva. Az eltérés a tüdőrákhoz viszonyítva sem volt szignifikáns (0,09;  $p>0,9999$ ). Bár mindegyik csoport értéke növekedett a kontrollhoz képest, a legjelentősebb növekedést a tüdőrák (0,09) csoport vonatkozásában figyeltem meg, a két csoport közti különbség statisztikailag is szignifikáns volt ( $p=0,0134$ ). A növekedést a komorbid csoport esetében főként az FA3G3 struktúra kismértékű, míg a COPD és a tüdőrák csoport esetében ugyanezen glikán szerkezet jelentős csúcsarány növekedése, illetve a mintában jelen lévő valamennyi mono-, valamint bigalaktozilált struktúra eltérő mértékű változása a kontroll csoport arányaihoz viszonyítva idézte elő.

Meghatároztam továbbá a vizsgált betegcsoportokban azonosított csúcsok területszázalékának relatív változását %-os értékben kifejezve a kontroll csoport azonos struktúráihoz viszonyítva. Az elemzés során ellentétes változást figyeltem meg az FA2 struktúra relatív csúcsterület % értékében, amely így potenciális molekuláris marker lehet, és amely segítségével hatékonyan elkülöníthető a COPD ( $-37,47\% \pm 1,12$ ) a tüdőráktól ( $+12,33\% \pm 0,22$ ), illetve mindkét tüdőbetegség elkülöníthető a struktúra vizsgálatával az egészséges kontroll csoporttól.

A komorbid betegcsoport relatív csúcsterület % értéke ugyanezen FA2 csúcs esetében csak kismértékben csökkent a kontroll csoporthoz képest ( $-0,60\% \pm 0,01$ ). A relatív csúcsterület negatív %-os változása figyelhető meg a kétantennás core-fukozilált biszekting FA2B, valamint a core-fukozilált kétantennás monogalaktozilált FA2[6]G1 és FA2[3]G1 vonatkozásában a kontroll csoporthoz viszonyítva a COPD (FA2B:  $-49,18 \pm 1,34$ ; FA2[6]G1:  $-49,09 \pm 0,63$ ; és FA2[3]G1:  $-44,92 \pm 1,20$ ), a tüdőrák (FA2B:  $-36,19 \pm 1,30$ ; FA2[6]G1:  $-22,49 \pm 0,26$ ; FA2[3]G1:  $-19,84 \pm 1,52$ ), valamint a komorbid (FA2B:  $-28,22 \pm 1,05$ ; FA2[6]G1:  $-34,21 \pm 0,03$ ; FA2[3]G1:  $-30,57 \pm 1,10$ ) csoportban egyaránt. Az FA2G2 struktúra esetében bár kisebb mértékű, de szintén negatív változás figyelhető meg mindhárom vizsgált csoportban a kontrollhoz viszonyítva (COPD:  $-15,94 \pm 0,58$ ; tüdőrák:  $-23,68 \pm 0,79$ ; komorbid:  $-20,04 \pm 0,56$ ). Ezen 4 glikán szerkezetet vizsgálva szintén elkülöníthetők a betegcsoportok a kontroll csoporttól.

Fontosnak tartom megjegyezni, hogy SPM modell és standard szérum analízise alapján az FA2, FA2B, FA2[6]G1 és FA2[3]G1 csúcsok valószínűleg IgG eredetűek.

A legnagyobb relatív csúcsterület-növekedés ( $+140,34\% \pm 3,73$ ) a tüdőrákban szenvedő betegek alkotta csoportban volt megfigyelhető a core-fukozilált háromantennás trigalaktozilált FA3G3 szerkezet esetében az egészséges kontrollhoz képest. Ugyanez a szerkezet  $+81,70\% \pm 0,69$  eltérést mutatott a COPD és csak  $+22,70\% \pm 1,53$  változást a komorbid betegeknél. Szintén

figyelemre méltó növekedést tapasztaltam a COPD-s betegek A3G3 csúcsának területszázalék változásában ( $+41,28\% \pm 1,19$ ) és a tüdőrákos csoportban egyaránt ( $+28,44\% \pm 0,82$ ), míg ezeknél jóval kisebb és ellentétes irányú, negatív változás volt megfigyelhető a komorbid betegek adatainak elemzése során ( $-1,83\% \pm 0,14$ ). Ez a két core-fukozilált háromantennás szerkezet az SPM és szérum analízis alapján feltételezhetően a haptoglobin akut-fázis fehérjéből származik.

Az A2G2 szerkezet bár a későbbi statisztikai elemzés során nem bizonyult szignifikánsan eltérőnek a csoportok között, az elsőként alkalmazott adatelemzési eljárásban pozitívan változott minden betegségcsoport esetében a kontrollhoz képest. Az A2G2 és az FA2G2 szerkezetek láthatóan mind az öt tanulmányozott fehérjéről származhatnak az SPM modellben és következésképpen a szérum mintákban is igen nagy arányban járulhatnak hozzá ezen csúcsok %-os értékeinek alakulásához. A legstabilabb N-glikán szerkezetnek az FA2BG2 tekinthető ezen elemzési módszer szerint, amely kevesebb, mint 10% -os változást mutatott az összes betegségcsoportban a kontrollhoz képest (COPD:  $+7,02\% \pm 0,45$ ; tüdőrák:  $-2,66\% \pm 0,03$  és komorbid:  $+1,21\% \pm 0,04$ ). A rendelkezésre álló adatok alapján úgy ítélem meg, hogy ez a csúcs az IgG-és IgA immunglobulinokról származhat.

A szérum minták N-glikán szerkezeteihez tartozó területszázalék értékek statisztikai analízise során a kontroll és a COPD csoportot összevetve 3 (FA2B,  $p=0,0134$ ; FA2[6]G1,  $p=0,0134$ ; és FA2[3]G1,  $p=0,0134$ ), míg a kontroll és a tüdőrák csoportot összehasonlítva 2 (FA2G2,  $p=0,0194$ ; és FA3G3,  $p=0,0134$ ) N-glikán szerkezet átlagos területszázalék értékében tapasztaltam szignifikáns eltérést. A két betegségcsoportot (COPD és tüdőrák) szintén 2 (FA2,  $p=0,0134$  és az FA2BG2,  $p=0,0194$ ), a COPD és a komorbid csoportokat csak egyetlen N-glikán szerkezet (A3G3,  $p=0,0134$ ) alapján tudtam elkülöníteni egymástól. Az A2G2 N-glikán struktúra volt az egyetlen olyan, humán szérumban detektált neutrális cukor szerkezet, amely a csoportok között nem mutatott szignifikáns eltérést.

## **4. Megbeszélés és Következtetések**

### **4.1. Humán szérum N-glikánprofil változása szobahőmérsékleten történő tárolás során**

Az N-glikom egyéni változékonysága tekintetében a mintagyűjtési idő és állapot (pl. tárolási hőmérséklet és idő), valamint a minta előkészítése során fellépő tényezők nagy jelentőséggel bírhatnak, ezért kísérleteim egyik központi kérdése az volt, hogy a teljes vér szobahőmérsékleten történő tárolása befolyásolja-e a centrifugálással kapott szérum minták globális N-glikánprofilját. A munka első részében 3 egészséges önkéntestől származó szérum minta teljes N-glikán tartalmának szobahőmérséklet hatására bekövetkező változását vizsgáltam kapilláris elektroforézissel, mely során 13 fő (legalább 1% területszázalékot elérő) N-kötött glikán szerkezetet azonosítottam. A szíálsavval terminált szerkezetek aránya a várakozásoknak megfelelően bár nem szignifikáns, de kismértékű, folyamatosan csökkenő tendenciát mutatott a szobahőmérsékleten való tárolási idő (30 perc, 90 perc, 150 és 270 perc) növekedésével, egészen a 150 perces mintáig. Ez követően azonban a 270 perces minta esetében az SF/NF arány növekedett és megközelítette a kiindulási értéket.

A 8 egészséges önkéntes szérum mintájának poolozásával kapott N-glikánprofil alakulását tanulmányozva a poolozott mintákban 16 olyan aszparagin-kötött glikán szerkezetet sikerült azonosítanom, amely relatív csúcsalatti területszázalék értéke elérte az 1%-ot. A minták szobahőmérsékleten töltött idejének növekedésével a SF/NF aránya a poolozott minták esetében is csökkenő tendenciát mutatott. A 150 percig tárolt szérum esetében a kontroll mintát is meghaladó SF/NF arány növekedést tapasztaltam. A növekedés mértéke a 90 perces és a 270 perces minták adataihoz képest volt szignifikáns.

A minták statisztikai elemzése során a 16 azonosított csúcsból 6 esetében tapasztaltam statisztikailag szignifikáns eltérést, azonban ezek az eltérések egyike sem a kontroll időpont és valamelyik egyéb vizsgált időpont között fordult elő. A jelentős változások minden esetben a kontrolltól eltérő időpontok között voltak megfigyelhetők.

#### **Konklúzió:**

A vérvételtől a centrifugálásig, majd a szérum minták fagyasztásáig eltelt idő függvényében dinamikus változást tapasztaltam az SF/NF arány tekintetében. A jelenség magyarázatául több tényező is szolgálhat:

- 1) a szérumban szabad szíálsav-transzferázok lépnek működésbe
- 2) limfociták és eritrociták felszínéről szabaddá váló glikán szerkezetek eltolják a kezdeti SF/NF arányt
- 3) esetleges gyenge hemolízis következtében az intracelluláris organelumokból felszabaduló N-glikánok jelennek meg a szérumban idővel, melyeket később a szabad exoglikozidázok degradálnak [23].

Ezek a jelenségek mind felelősek lehetnek az idő előrehaladtával tapasztalt szíálsavas-neutrális szerkezetek arányában tapasztalt változásokért. Ezért a preanalitikai tényezők hatásaitól mentes glikánprofil tanulmányozása érdekében célszerűnek tartottam a mintákat a lehető legrövidebb időn belül centrifugálni, szeparálni a szérumot a vér alakos elemeitől és további glikozilációs elemzésig fagyasztva tárolni. Amennyiben ez nem történik meg, a kapott eredmény nem minden időpontban tükrözi a vérvételkori aktuális glikozilációs állapotot.

Mindazonáltal eredményeim arra utalnak, hogy a teljes vérminta centrifugálásig szobahőmérsékleten történő tárolásának nincs jelentős hatása a szérum N-glikom alakulására a vizsgálati csoportokon belüli szórás növelésén túl, abban az esetben, ha a jelen dolgozatban szimulált mintakezelési hiba (hosszabb idejű tárolás szobahőmérsékleten centrifugálás előtt) a vizsgálatra gyűjtött minták jelentős részénél nem fordult elő. A dolgozatban vizsgált körülmények által előidézhető szórásnövekedés kiküszöbölésére megoldást jelenthet a minták poolozása abban az esetben, ha a betegadatok egyénenkénti elemzése és összehasonlítása nem célunk. A poolozás ugyanis a szórás csökkentése mellett jelentősen csökkenti a mintafeldolgozás idő- és költségigényeit, ezzel párhuzamosan pedig kiemeli az adott csoportra leginkább jellemző N-glikozilációs tulajdonságokat.

A munkám eredményeként kijelenthető, hogy a vizsgált körülmények között a szérum N-glikom viszonylag stabil biomarker forrásnak tekinthető.

## **4.2. Az elhízással és gesztációs diabétesszel társuló terhesség hatása az anyai és gyermeke szérumból izolált IgG N-glikozilációjára**

### **4.2.1. Anyai és gyermek szérumból izolált IgG N-glikozilációs mintázatának alakulása**

Munkám során első lépésként meghatároztam az anyai és a gyermek szérumból izolált IgG antitestek N-glikán összetételét CE-LIF alkalmazásával. Az anyai IgG vonatkozásában 14, míg a csecsemők esetében 13 N-kötött cukorstruktúrát tudtam azonosítani. Az anyai és gyermek SF/NF arány összehasonlítása során az egészséges kontroll anyák és gyermekeik (HNW,  $p=0,026$ ), valamint az elhízott anyák és gyermekeik között (HOB,  $p=0,0087$ ) találtam statisztikailag szignifikáns eltérést.

#### **Konklúzió:**

Mivel az elhízott anyák esetében a kontrollhoz hasonlóan szignifikáns eltérést tapasztaltam az anyai és gyermek szérumból izolált IgG N-glikozilációjának SF/NF arányában, amely arány a kontroll csoport arányával ellentétes irányú (HNW anyák SF/NF= $0,33 \pm 0,01$  és gyermekeik SF/NF= $0,30 \pm 0,03$ ; HOB anyák SF/NF= $0,29 \pm 0,02$  és gyermekeik SF/NF= $0,34 \pm 0,02$ ), így megállapítottam, hogy mind az elhízás, mind a GDM befolyásolhatja a placentáris transzportfolyamatokat. A kapott eredmények tovább erősítik azt a feltételezést, miszerint a méhlepény képes lehet „érzékelni” az anyai környezetet és alkalmazkodva ahhoz megvédeni a magzatot az anyai elhízásban és gesztációs diabetesben jelenlévő káros gyulladásos, oxidatív, hiperinzulinemiás környezettől [24]. Így a korábbi vizsgálati eredményeket is figyelembe véve úgy gondolom, hogy a jövőben további alanyok bevonásával alosztály és kötőhelyspecifikus IgG N-glikozilációs analízis elvégzése lenne célszerű, kiegészítve a placenta gyulladásos markereinek analízisével. Ezen vizsgálatokkal közelebb juthatunk az antitestek méhlepényen keresztüli transzportfolyamatainak, és ezáltal a magzat immunrendszerének fejlődését befolyásoló tényezők a jobb megértéséhez is.

### **4.2.2. Anyai elhízás és gesztációs diabetes hatása az anyai szérumból izolált IgG N-glikozilációjára**

Az anyai szérumból izolált IgG N-glikomikai elemzése során az azonosított 14 struktúra közül 11 mutatott szignifikáns eltérést valamely vizsgált csoport között. Ebből 10 szerkezet tért

el szignifikánsan a kontroll és valamely, elhízással, GDM kialakulásával, esetleg mindkettővel szövődött anyai csoport között.

### **Konklúzió:**

Az SF/NF arány összehasonlítása során bár kizárólag az elhízott (HOB) anyák esetében tapasztaltam szignifikáns, de kismértékű csökkenést az NWGDM csoport szialiláltságához viszonyítva ( $p=0,0197$ ), megfigyelhető volt az OGDM csoport SF/NF arányának csökkenése is a kontroll és az NWGDM csoporthoz viszonyítva. Az eredmények, miszerint statisztikai szempontból is szignifikáns eltérés csak a HOB és az NWGDM csoportok közötti volt, illetve hogy az arányszám az NWGDM csoportjában egyáltalán nem változott a kontrollhoz viszonyítva azt jelzi, hogy az IgG N-glikozilációjára inkább az elhízásnak, mintsem a GDM-nek van hatása az édesanyák esetében. Így a tapasztalt csökkent SF/NF arány az elhízás során fellépő gyulladásos folyamatokat jelezheti, ugyanakkor a kismértékű változások lehetséges oka az IgG N-glikozilációjának terhesség előtti állapotára történő fokozatos visszatérése is lehet a szülést követően [25]. Emiatt a GDM okozta esetleges változások már kevésbé észlelhetők a két érintett csoportban. A GDM csoport vizsgálatának eredményei ugyanakkor összhangban állnak egy nemrégiben megjelent kutatás eredményével, amely szerint az IgG N-glikozilációja alapján nem lehet elkülöníteni egymástól a normál és a GDM édesanyák csoportjait [26], így eredményeim alapján megerősíthetem, hogy az IgG N-glikozilációs vizsgálata feltehetően nem alkalmas a GDM kialakulásának előrejelzésére. A szintén krónikus gyulladásal járó reumatoid arthritisz esetén a terhesség során az IgG Fc régiójához konzerváltan kapcsolódó N-glikán szerkezetek galaktozilációjának és szialilációjának a növekedéséről számoltak be a betegség javulásával párhuzamosan [27] [28], így feltételezhető, hogy a terhesség során végbemenő hormonális változások képesek valamelyest ellensúlyozni az elhízás és a GDM káros hatásait, melyeket IgG N-glikozilációs vizsgálatokkal esetleg feltárhatnánk.

Mivel azonban az OGDM csoport magasabb SF/NF aránnyal rendelkezett, mint a HOB csoport, illetve jelentős eltérést figyeltem meg a méhlepényen keresztül a gyermekekbe átjutott IgG N-glikozilációjában, így a kapott eredmény alapján további vizsgálatok elvégzését tartom indokoltnak akár nagyobb anya-gyermek párokból kialakított csoportokkal.

Mivel az FABG2S2 szerkezet szignifikáns eltérést mutatott a kontroll és a HOB, valamint a kontroll és az OGDM csoportok között, így a szerkezet az elhízás hatásait tükrözheti, nyomonkövetése esetleges további vizsgálatok során javasolt.

#### **4.2.3. Anyai elhízás és gesztációs diabétesz hatása a gyermekek szérumból izolált IgG antitestek N-glikozilációjára**

A vizsgált csoportok édesanyjától született gyermekek esetében 13 azonosított komplex N-kapcsolt cukorstruktúra közül 9 relatív területszázalék megoszlásában tapasztaltam statisztikai szempontból is szignifikáns eltérést a csoportok között. Ezen struktúrákból 3 alapján tudtam a kontroll csoportot az HOB (FA2(3)G1S1, FA2[6]G1, FA2B[6]G1), és 4 alapján az NWGDM (FA2G2S2, A2G2S1, FA2[6]G1, FA2[3]G1) anyáktól született gyermekek csoportjaitól elkülöníteni.

A minták SF/NF arányában a kontroll csoport értékéhez képest mind az elhízott anyák gyermekei, mind a normál testsúllyal rendelkező GDM anyáktól született gyerekek esetében kismértékű növekedést tapasztaltam, míg mindkét rendellenességet mutató csoportban érdekes módon a kontrollal megegyező értéket kaptam.

Szignifikáns a HNW és HOB ( $p=0,0423$ ), HOB és OGDM ( $p=0,0225$ ), valamint az NWGDM és OGDM ( $p=0,033$ ) csoportok közötti különbség volt.

#### **Konklúzió:**

Az adatok tükrében megállapítható, hogy:

- 1) Mind az elhízás, mind a GDM befolyásolhatja a gyermekekben detektált IgG molekulák N-glikozilációjának szialiláltságát.
- 2) Feltételezhető, hogy a placentán az inkább antiinflammatorikus hatással rendelkező antitestek jutnak át, kompenzálva az anyaméh esetleges gyulladásos környezetét, mivel az elhízással és GDM-vel társult terhességből születő csecsemők IgG N-glikánjai megnövekedett SF/NF aránnyal rendelkeznek. A szialsavas szerkezetek arányának növekedése az IgG antiinflammatorikus hatásait erősíti.
- 3) A glikoziláció szelektív IgG transzport [29] ennek a védelmi mechanizmusnak része lehet, mely eredményeként gyulladásos körülmények között a placenta a magasabb szialilációval rendelkező molekulákat részesítheti előnyben.
- 4) Ezen mechanizmus sérülésére utalhat az OGDM csoport gyermekei esetében tapasztalt csökkent szialiláció

Az eredmények további vizsgálatok elvégzését sürgetik a terhesség során fellépő betegségek placentáris transzportfolyamatokra gyakorolt, valamint annak az utódokra kifejtett hatásának megértéséhez.

#### 4.3. IgA N-glikozilációs módosulásai elhízás és gesztációs diabétesz hatására

Mivel korábban Steffen és mtsai. kimutatták, hogy a szérumban IgA N-glikozilációs profilja és a molekula proinflammatorikus hatása között összefüggés áll fenn [30], így az IgG molekulához hasonlóan az IgA N-glikozilációs módosulásai a szervezetben aktuálisan zajló különböző gyulladásos folyamatok, így az elhízás és a GDM hatásainak hatékony markereként is szolgálhatnak. Vizsgálataim során az IgA N-glikán szerkezetei közül 15 komplex cukorstruktúra mutatott statisztikai szempontból szignifikáns eltérést legalább két csoport között. Az elhízott anyák csoportja a kontroll csoporttól csak egyetlen N-glikán szerkezet alapján volt elkülöníthető (A2[3]G1S1,  $p=0,0042$ ). A kontroll és a NWGDM csoport 3 szerkezet (FA1[6]+A2BG2S1; A1G1[6]), míg a kontroll és az OGDM anyák csoportjai 7 struktúra (FA2BG2S2; A[3]; M5; A1G1[6]; FA1[3]G1; A2G2 és FA2G2) alapján voltak megkülönböztethetők. A SF/NF arány tekintetében nem tapasztaltam szignifikáns eltérést a csoportok között.

#### Konklúzió:

Eredményeim alapján az alábbi megállapítások tehetők:

- 1) Az IgA A1G1[6] N-glikán szerkezete mivel statisztikailag szignifikánsan eltért a kontroll és az NWGDM, valamint a kontroll és az OGDM csoportok között is, így a szerkezet alkalmas lehet a GDM kialakulásának előre jelzésére a BMI-től függetlenül.
- 2) Az A2G2, FA2G2, valamint az M5 szerkezetek alkalmasak lehetnek az elhízással társuló GDM előrejelzésére, mivel százalékos értékük szignifikánsan kizárólag a HNW és OGDM csoportok között tért el. Ezen struktúrák további vizsgálatát javasolt.
- 3) Megállapítottam, hogy az IgA teljes N-glikozilációs profilját az elhízás kevésbé befolyásolja, mint a GDM, ennek megfelelően potenciális markere lehet az anyai BMI-től függetlenül a GDM kialakulásának és esetleges visszamaradó hatásainak.
- 4) Az IgA antitestek szialiláltságát azonban sem az elhízás, sem pedig a GDM nem befolyásolja, így az IgA nem alkalmas a gyulladásos folyamatok fennállásának jelzésére a vizsgált esetekben.

#### **4.4. Szérum N-glikozilációs profiljának modellezése és az új megközelítés alkalmazása különböző tüdőbetegségek N-glikozilációs analízisében**

Az IgG és IgA immunglobulinok N-glikozilációs analíziséhez szükséges mintamennyiség, valamint analízisidő szignifikáns csökkentése érdekében munkám során kidolgoztam egy új potenciális módszert, mely révén a szérum minta egészének vizsgálatával nyerhetünk kellő információt a szérumban legnagyobb mennyiségben jelen lévő két antitest N-glikozilációs módosulásairól. Az SPM modellel sikeresen modelleztem a humán szérum szialidáz enzimmel kezelt N-glikánprofilját, a kidolgozott módszerrel (SPM) lehetőség nyílik a két immunglobulin mellett a szérum további 3, nagy koncentrációjú glikoproteinjének N-glikomikai tanulmányozására.

A modell megalkotását követően egészséges kontroll, COPD-ben, tüdőrákban, valamint a két kórképben együttesen szenvedő betegek szérum N-glikomjának változásait tanulmányoztam a betegségek hatékony elkülönítése érdekében. A betegek szérum mintáiban a modellhez és a módszer kidolgozásához kontrollként alkalmazott standard humán szérumhoz hasonlóan szintén 9 N-glikán szerkezetet azonosítottam a teljes profil szialidáz enzimmel történő emésztését követően. Az eredmények értékelése során meghatároztam a teljes szérum N-glikomjában lévő elágazással rendelkező struktúrák mértékét, mely során statisztikailag szignifikáns eltérést csak a kontroll és a tüdőrákban szenvedő betegek csoportja között tapasztaltam ( $p=0,0134$ ).

A csoportok egyes csúcsai között tapasztalt változások jobb szemléltetése és könnyebb megértése érdekében meghatároztam a kontroll csoport azonos struktúráihoz viszonyított relatív változások mértékét. Eredményeim rávilágítottak arra, hogy a jól detektálható és azonosítható FA2 struktúra potenciális glikobiomarker lehet, melynek segítségével hatékonyan elkülöníthető a COPD a tüdőráktól, illetve mindkét tüdőbetegség az egészséges kontroll csoporttól.

A csoportok eredményeinek statisztikai analízise során a kontroll és a COPD csoport 3 (FA2B, FA2[6]G1 és FA2[3]G1), míg a kontroll és a tüdőrák csoport 2 (FA2G2 és FA3G3) N-glikán szerkezetének átlagos területszázalék értéke mutatott szignifikáns eltérést. A két betegségcsoportot (COPD és tüdőrák) szintén 2 (FA2 és az FA2BG2), a COPD és a komorbid csoportokat csak egyetlen N-glikán szerkezet (A3G3) alapján tudtam elkülöníteni egymástól.

## **Konklúzió:**

A standard fehérjekeverékkel végzett kísérleteim eredményei alapján a humán szérumban jelen lévő 5 nagy koncentrációjú glikoprotein N-glikozilációs változásai jó közelítéssel tanulmányozhatók a teljes szérum analízisével, ezáltal felgyorsítva az analízisidőt és jelentősen lecsökkentve a vizsgálatok minta- és költségigényét. Azaz a teljes szérum totál N-glikánprofil tartalma által közvetített információtartalom kellően informatív és nincs szükség sok esetben az egyes szérumfehérjék izolálására és külön-külön történő analízisére. A fennmaradó hozzávetőlegesen 15% jelenléte okozta egyéni különbségek elhanyagolhatók abban az esetben, ha a tanulmányozni kívánt fehérje elég nagy koncentrációban van jelen a szérumban, vagyis akkor, ha a dolgozatban is vizsgált 5 fehérje valamelyikén N-glikozilációs változásokat feltételezünk. Ugyanakkor ebben az esetben is érdemes lehet specifikus tisztítást követően tanulmányozni a fehérje N-glikozilációját, ha a teljes N-glikánprofilban a kontrollhoz viszonyítva eltéréseket tapasztalunk. Annyi azonban biztos, hogy sok esetben a bonyolult, tapasztalatot igénylő, időt és költséget nem kímélő eljárások nélkül is feltárhatunk olyan különbségeket, amelyek patológiás folyamatokra utalhatnak. Ennek feltétele azonban minden esetben az előzetes szakorvosi vélemény és a feltételezett betegség ismerete (tudnunk kell, hogy a vizsgált beteg feltehetően valamilyen tüdőbetegségben szenved, jelen esetben COPD-s).

Ennek megfelelően a betegellátáshoz tartozó rendszeres vizsgálatok során érdemes lehet monitorozni a szérum teljes N-glikánprofilját is annak érdekében, hogy még kellően korai stádiumban azonosítani tudjunk a rizikócsoporthoz tartozó egy esetleges kóros setjburjánzást, legoptimálisabb esetben még a képalkotó eljárásokkal való kimutathatóság előtt, amely a kezelés és a beteg túlélési esélyeinek szempontjából is kulcsfontosságú lehet. Sajnos Magyarországon rendszeres és szervezett tüdőrák szűrés nincs, a COPD betegellátásban és a rákszűrésben is röntgen képalkotást (rtg) alkalmaznak, mint elsőként elvégzendő diagnosztikai módszert, holott tudjuk, hogy a rtg a korai stádiumú tüdőrák kimutatására alkalmatlan. A rutindiagnosztika kiegészítve a szérum teljes N-glikozilációs analízisével minimális költségnövekedés mellett lehet kellően informatív a beteg állapotát illetően.

A COPD, a tüdőrák és komorbid csoportok a szérum N-glikánprofiljának elágazás mértéke alapján nem különíthetők el egymástól, így ezen tulajdonság biomarkerként való alkalmazása a betegcsoportok hatékony elkülönítésére eredményeim alapján nem lehetséges.

Bár a szérum N-glikozilációs analízisével a komorbid betegcsoportot sem a kontroll, sem a tüdőrák csoportoktól nem tudtam elkülöníteni az adatok statisztikai elemzésével, a fenti N-

kapcsolt glikán szerkezetek betegségsspecifikus biomarkerek lehetnek, ezért követésük és további analízisük mindenképpen javasolt.

Mivel a SPM eredményekből arra következtetek, hogy a csoportok között statisztikai szempontból szignifikáns eltérést mutató szerkezetek jelentős része a szérumban keringő IgG antitestek N-glikozilációs állapotát tükrözik, így kijelenthető, hogy az IgG molekula N-glikozilációs vizsgálata mind a tüdőt érintő daganatos, mind pedig a különböző gyulladásos kórképek diagnosztikájában jelentőséggel bírhat.

Eredményeim azt mutatják, hogy a gyulladásos és daganatos tüdőbetegségben szenvedő páciensektől származó szérum minták N-glikomikai elemzése hasznos és gyors, előzetes molekuláris diagnosztikai információt szolgáltat a globális N-glikozilációs változásokról és azok potenciális glikoprotein forrásairól.

## 5. Legfontosabb eredmények

1. A vérvételtől számított 4 és fél órán belül a teljes vérminta centrifugálásig szobahőmérsékleten történő tárolásának nincs jelentős hatása a szérum N-glikom alakulására, így a szérum viszonylag stabil glikobiomarker forrásnak tekinthető.
2. Az egészséges terhes nőkből a placentán keresztül a magzatba átjutó IgG alacsonyabb szialilációs fokkal rendelkezik.
3. A IgG nem alkalmas glikobiomarker a GDM, az azzal társuló gyulladás, illetve a GDM-ből esetlegesen eredő anyai komplikációk jóslására.
4. Ezzel szemben az IgG N-glikán szerkezetei tükrözik az anyai elhízás során fellépő esetleges gyulladást a várandósság ideje alatt is.
5. A placentán átjutó IgG molekulák N-glikozilációjára mind az anyai elhízás, mind pedig a gesztációs diabétesz hatással van. Ez a hatás detektálható a gyermekekből izolált IgG molekulák N-glikozilációjának szialilaltságán keresztül.
6. Mivel az elhízott és a GDM meglétével diagnosztizált édesanyáktól született gyermekek IgG molekuláinak N-glikán szerkezeteit termináló sziálsavak aránya magasabb volt, mint a kontroll csoport gyermekei esetében tapasztalt érték, így feltételezhető, hogy méhlepény képes alkalmazkodni az anyai gyulladásos környezethez megvédve a magzatot az anyai elhízásban és GDM-ben jelenlévő káros gyulladásos, oxidatív, hiperinzulinemiás környezettől.

7. A védelmi mechanizmusnak része lehet a glikoziláció szelektív IgG transzport, mely eredményeként gyulladásos körülmények között a placenta a magasabb szialilációval rendelkező molekulákat részesítheti előnyben. A mindkét rendellenességgel rendelkező anyák és gyermekeik esetében tapasztalt csökkent gyermeki IgG szialiláció ennek a védelmi mechanizmusnak a határait jelezheti, ahol már nem képes a placenta a káros körülmények kompenzálására.
8. Az IgA N-glikozilációs változásai betegségsspecifikus biomarkerként szolgálhatnak a GDM vonatkozásában.
9. Az IgA szialsav/neutrális szerkezetinek arányát sem az elhízás, sem a GDM, sem pedig a két rendellenesség együttes megléte nem befolyásolta a várandós édesanyák esetében. Ezért az IgA nem alkalmas a gyulladásos folyamatok meglétének jelzésére.
10. Kidolgozásra került egy glikoanalitikai megközelítés, mellyel a szérumban jelen lévő IgG és IgA antitest N-glikozilációs módosulásairól, csökkentve a fehérjék elemzéséhez szükséges minta-, anyag-, illetve időigényt.
11. Számos N-kötött glikán szerkezetet azonosítottam szérumszinten, amelyek alapján sikeresen különítettem el a COPD, tüdőrák és komorbid betegcsoportokat egymástól, valamint a kontroll csoporttól.
12. Az IgG potenciális biomarker lehet a tüdőrák és COPD diagnosztizálásban, a betegcsoportok között szignifikáns eltérést mutató szerkezetek jelentős része ugyanis a kidolgozott modell alapján az IgG antitestekről származik.
13. A humán szérumban minták N-glikomikai elemzése gyulladásos és daganatos tüdőbetegségek vonatkozásában gyors, előzetes molekuláris diagnosztikai információt szolgáltat a szérumban N-glikom változásairól és azok potenciális glikoprotein forrásairól.

## 6. Összefoglalás

PhD munkám során a vérminta levételétől a centrifugálásig, majd a fagyasztásig szobahőmérsékleten (24-25°C) történő tárolásának N-glikán összetételére gyakorolt esetleges hatását tanulmányoztam CE-LIF készülék alkalmazásával. Kuttásom célja volt, hogy megvizsgáljam a szérum N-glikom stabilitását és az abban betegségek hatására tapasztalt változások biomarkerként való alkalmazhatóságát. Vizsgálataim eredményeként megállapítottam, hogy a 4 és fél órán belüli szobahőmérsékleten való tárolásnak nincs jelentős hatása az N-glikánprofilra. Munkám eredményeként így kijelenthető, hogy az általam alkalmazott, és a klinikai laboratóriumokban is rutinszerű vizsgálati körülmények között a szérum N-glikom viszonylag stabil biomarkerforrásnak tekinthető.

Mind az elhízás, mind a GDM napjainkban egyre növekvő gyakorisággal fordulnak elő. Az elhízás és a GDM káros hatással lehet az anyára és születendő gyermekére egyaránt, így a növekvő esetszámokat is figyelembe véve, egyre nagyobb igény mutatkozik olyan biomarkerek azonosítására és egységes klinikai alkalmazására, melyek előre jelezhetik a GDM kialakulását, valamint annak hatásait anyára és gyermekére. Az anyai és gyermek szérum eredetű IgG, valamint az anyai szérum IgA N-glikozilációja ígéretes markernek bizonyult vizsgálataim során az elhízás és/vagy GDM kialakulásának és/vagy hatásának jelzésére.

Eredményeim alapján megállapítottam, hogy az IgG N-glikán szerkezeteinek változásai az anyai elhízást jól tükrözik, viszont a GDM kialakulását nem képesek jelezni. Ezzel szemben az IgA a GDM kialakulásának jóslására potenciális glikobiomarker forrásnak bizonyult.

A gyermek és anyai IgG glikozilációjának összehasonlítása során megállapítottam, hogy mind az anyai elhízás, mind a GDM befolyásolja a placentáris transzportfolyamatokat.

Célszerűnek tartom további alanyok bevonásával alosztály és kötőhelyspecifikus IgG glikozilációs analízis elvégzését, kiegészítve a placenta gyulladásos markereinek analízisével. Ezáltal közelebb juthatunk az antitestek méhlepényen keresztüli transzportfolyamatainak, és így a magzat immunrendszerének fejlődését befolyásoló tényezőinek jobb megértéséhez.

A dolgozat utolsó részében bemutatásra került egy olyan új megközelítés (SPM modell), mely révén hatékonyan tanulmányozható a fenti két Ig osztály N-kapcsolt glikozilációs módosulása további három, az emberi szérumban nagy koncentrációban jelen lévő haptogloblin, transferrin és alfa-1-antitripszin fehérjékkel egyidőben.

A kidolgozott modellt alkalmazva különböző gyulladásos és daganatos tüdőbetegségben szenvedők csoportjait vizsgáltam olyan biomarkerek azonosítása céljából, melyek alapján elkülöníthetők egymástól a COPD-s, tüdőrákkal, valamint mindkét betegség meglétével diagnosztizált betegcsoportok. Munkám során meghatároztam ezen csoportok szérumban mintáinak deszialilált N-glikánprofiljához tartozó antennáris elágazás mértékét, mely a tüdőrák és a kontroll csoport elkülönítését tette lehetővé.

A statisztikai elemzés mellett bevezettem egy új értékelési eljárást, mellyel az azonosított szerkezetek relatív területszázalék változását vizsgáltam. A módszer alkalmazásával számos olyan glikán szerkezetet tudtam azonosítani, amely a jövőben segíthet a betegség diagnosztizálásában. Ezek közül kiemelendő az *core-fukozilált kétantennás agalaktozilált* struktúra (FA2), mely segítségével hatékonyan elkülöníthető a COPD a tüdőráktól, illetve mindkét tüdőbetegség az egészséges kontroll csoporttól.

Az egyes szerkezetek statisztikai elemzésének eredményét figyelembe véve az SPM modell alapján kijelenthető, hogy az IgG molekula glikozilációs analízise a tüdőt érintő daganatos és különböző gyulladásos betegségek (COPD) diagnosztikájában jelentőséggel bírhat.

A vizsgált tüdőbetegségekben szenvedő páciensektől származó szérumban minták N-glikomikai elemzése fontos kiegészítő és gyors, előzetes molekuláris diagnosztikai információt szolgáltat a globális N-glikozilációs változásokról és azok potenciális glikoproteinforrásairól, azáltal a jövőben megkönnyítve a diagnózis felállítását és a terápiás döntéshozatalt.

## 7. Irodalomjegyzék

1. Boerma, T.A.-Z., C; Kinfu, Y, *World health statistics 2008*. 2008: WHO Pres.
2. Deng, T., et al., *Obesity, Inflammation, and Cancer*. *Annu Rev Pathol*, 2016. **11**: p. 421-49.
3. Wilson, R.M. and I. Messaoudi, *The impact of maternal obesity during pregnancy on offspring immunity*. *Mol Cell Endocrinol*, 2015. **418 Pt 2**: p. 134-42.
4. Ygberg, S. and A. Nilsson, *The developing immune system - from foetus to toddler*. *Acta Paediatr*, 2012. **101**(2): p. 120-7.
5. de Jong, S.E., et al., *IgG1 Fc N-glycan galactosylation as a biomarker for immune activation*. *Scientific Reports*, 2016. **6**(1): p. 28207.
6. Barnes, P.J. and I.M. Adcock, *Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: a lethal association*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011. **184**(8): p. 866-7.
7. Szigeti, M. and A. Guttman, *Sample Preparation Scale-Up for Deep N-glycomic Analysis of Human Serum by Capillary Electrophoresis and CE-ESI-MS*. *Mol Cell Proteomics*, 2019. **18**(12): p. 2524-2531.
8. Reider, B., M. Szigeti, and A. Guttman, *Evaporative fluorophore labeling of carbohydrates via reductive amination*. *Talanta*, 2018. **185**: p. 365-369.
9. Goonatilleke, E., et al., *Immunoglobulin A N-glycosylation Presents Important Body Fluid-specific Variations in Lactating Mothers*. *Mol Cell Proteomics*, 2019. **18**(11): p. 2165-2177.
10. Mesko, B., et al., *Peripheral blood gene expression and IgG glycosylation profiles as markers of tocilizumab treatment in rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 2012. **39**(5): p. 916-28.
11. Meszaros, B., et al., *N-glycomic Analysis of Z(IgA1) Partitioned Serum and Salivary Immunoglobulin A by Capillary Electrophoresis*. *Curr Mol Med*, 2020. **20**(10): p. 781-788.
12. Secchiero, S., L. Sciacovelli, and M. Plebani, *Harmonization of units and reference intervals of plasma proteins: state of the art from an External Quality Assessment Scheme*. *Clin Chem Lab Med*, 2018. **57**(1): p. 95-105.
13. 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.
14. Jarvas, G., M. Szigeti, and A. Guttman, *Structural identification of N-linked carbohydrates using the GUcal application: A tutorial*. *J Proteomics*, 2018. **171**: p. 107-115.
15. Friedman, M., *The Use of Ranks to Avoid the Assumption of Normality Implicit in the Analysis of Variance*. *Journal of the American Statistical Association*, 1937. **32**(200): p. 675-701.
16. Sinkovits, G.P.Z. *Paraméteres és nem paraméteres próbák alkalmazása több csoport összehasonlítására folytonos változók esetén*. 2021; Available from: [https://semmelweis.hu/kutlab/files/2021/03/Csoportok\\_%C3%B6sszehasonl%C3%ADt%C3%A1sa\\_2021\\_SGy.pdf](https://semmelweis.hu/kutlab/files/2021/03/Csoportok_%C3%B6sszehasonl%C3%ADt%C3%A1sa_2021_SGy.pdf).

17. Dunn, O.J., *Multiple Comparisons Using Rank Sums*. Technometrics, 1964. **6**(3): p. 241-252.
18. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, *The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(11): p. 845-67.
19. 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.
20. Kovacs, Z., et al., *Capillary electrophoresis analysis of N-glycosylation changes of serum paraproteins in multiple myeloma*. Electrophoresis, 2017. **38**(17): p. 2115-2123.
21. Mariño, K., et al., *Changes in serum N-glycosylation profiles: Functional significance and potential for diagnostics*. Carbohydrate Chemistry, 2011. **37**: p. 57-93.
22. Arnold, J.N., et al., *Novel glycan biomarkers for the detection of lung cancer*. J Proteome Res, 2011. **10**(4): p. 1755-64.
23. Dedova, T., et al., *The effect of blood sampling and preanalytical processing on human N-glycome*. PLoS One, 2018. **13**(7): p. e0200507.
24. Denison, F.C., et al., *Obesity, pregnancy, inflammation, and vascular function*. Reproduction, 2010. **140**(3): p. 373-85.
25. Ruhaak, L.R., et al., *Total plasma N-glycome changes during pregnancy*. J Proteome Res, 2014. **13**(3): p. 1657-68.
26. Štambuk, T., et al., *Associations between plasma protein, IgG and IgA N-glycosylation and metabolic health markers in pregnancy and gestational diabetes*. 2021.
27. Raju, T.S. and S.E. Lang, *Diversity in structure and functions of antibody sialylation in the Fc*. (1879-0429 (Electronic)).
28. Bondt, A., et al., *Association between Galactosylation of Immunoglobulin G and Improvement of Rheumatoid Arthritis during Pregnancy Is Independent of Sialylation*. Journal of Proteome Research, 2013. **12**(10): p. 4522-4531.
29. Williams, P.J., et al., *Short communication: selective placental transport of maternal IgG to the fetus*. (0143-4004 (Print)).
30. Steffen, U., et al., *IgA subclasses have different effector functions associated with distinct glycosylation profiles*. Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 120.

## 8. Publikációs lista



**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/369/2022.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Farkas Anna

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Török, R., **Farkas, A.**, Guttman, A., Járvás, G.: Evaluation of Possible Processing Time Effects on the Global N-Glycosylation Profile of Human Blood Samples.  
*Curr. Mol. Med.* 20 (10), 840-846, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1566524020666201230094722>  
IF: 2.222
2. **Farkas, A.**, Mészáros, B., Szarka, M., Szigeti, M., Kappelmayer, J., Szabó, M., Csánky, E., Guttman, A.: Modeling of the Desialylated Human Serum N-glycome for Molecular Diagnostic Applications in Inflammatory and Malignant Lung Diseases.  
*Curr. Mol. Med.* 20 (10), 765-772, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1566524020666200422085316>  
IF: 2.222





### **További közlemények**

3. Mészáros, B., Járvás, G., **Farkas, A.**, Szigeti, M., Kovács, Z., Kun, R., Szabó, M., Csánky, E.,  
Guttman, A.: Comparative analysis of the human serum N-glycome in lung cancer, COPD  
and their comorbidity using capillary electrophoresis.  
*J. Chromatogr. B.* 1137, 1-7, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121913>  
IF: 3.205

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 7,649**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
4,444**

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, 2022.07.14.

