

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**ÚJ MEGKÖZELÍTÉSEK *N*-GLIKÁNOK ANALÍZISÉRE
KAPILLÁRIS GÉLELEKTROFORÉZISSEL**

Kerékgyártó Márta Zsuzsa

Témavezető: Prof. Dr. Guttman András



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2017

ÚJ MEGKÖZELÍTÉSEK N-GLIKÁNOK ANALÍZISÉRE KAPILLÁRIS GÉLELEKTROFORÉZISSSEL

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Kerékgyártó Márta Zsuzsa okleveles molekuláris biológus

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

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

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Csősz Éva, PhD
Dr. Drahos László, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettani Intézet
Könyvtára, 2017. május 2. 12 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Szökő Éva, az MTA doktora
Dr. Gáspár Attila, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Szökő Éva, az MTA doktora
Dr. Gáspár Attila, az MTA doktora
Dr. Csősz Éva, PhD
Dr. Drahos László, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati
Intézet „A” épület tanterme, 2017. május 2. 14 óra

1. BEVEZETÉS

Az elválasztástechnika jelentősége nem csupán a tudományos világban, de a mindennapokban is fontos, mivel a kutatási eredmények gyakorlati alkalmazásai mindennapjaink szerves részét képezik. Az elválasztástechnikában régóta nagy szerepet játszó elektroforézis olyan bioanalitikai módszer, ahol az eltérő elektroforetikus mozgékonyssággal rendelkező töltött részecskék elektromos erőterben különböző sebességgel mozognak, így egymástól elválaszthatók. Az elektroforézist, mint elválasztási technikát a svéd Nobel-díjas Arne Tiselius vezette be 1937-ben. 1950-es évektől a hagyományos lap gélelektroforézis módszert rutinszerűen használják a nagyméretű biopolimerek, mint például nukleinsavak, fehérjék és komplex szénhidrátok méret szerinti elválasztására. Ugyan a hagyományos lap gélelektroforézis az egyik legszélesebb körben alkalmazott elválasztástechnikai módszer a molekuláris biológiában és a biokémiában, azonban hosszú elemzési időt igényel, emellett kis elválasztási hatékonysággal rendelkezik és nehezen automatizálható.

A kapilláris gélelektroforézis (capillary gel electrophoresis, CGE) a hagyományos lap gélelektroforézis automatizált műszeres változata, amely a folyadékromatográfia és a hagyományos lap gélelektroforézis előnyeit ötvözi. A CGE módszer nemcsak a biopolimerek elválasztására használható, hanem egyéb területeken is, ahol eddig elektroforézist nem alkalmaztak (pl. élelmiszeralitika, kriminalisztika, környezetvédelem, stb.). Ezenkívül az elválasztást rövid mérési idő, nagy elválasztási hatékonyság, közvetlen detektálási technika és teljes automatizálhatóság jellemzi, amely hozzájárult a Humán Genom Projekt (HUGO) tervezettnél jóval korábbi befejezéséhez. Bár az első CE készülékek egyszerű pufferoldatban tették lehetővé az elválasztást, főbb előnyei azonban a hagyományos lap gélelektroforézissel szemben, hogy sokféle gél-mátrix használható (pl. agaróz, poliakrilamid, PEO, PVP vagy SDS-gél alapú töltött kapillárisok), emellett összetételük széles tartományban változhat. Az elválasztásokhoz legtöbbször keresztköttött vagy lineáris polimer alapú géleket használnak. A módszer alkalmazási területe nem csupán az analitikai elválasztásokra korlátozódik, hanem segítségével molekulák közötti kölcsönhatások tanulmányozása és enzimkinetikai mérések is megoldhatók.

Emellett az utóbbi években egyre inkább előtérbe került a mikrocsip (lab-on-a chip) alapú mikroelektroforetikus elválasztás is, amely biológiaiilag fontos molekulák hatékony és gyors elválasztására is alkalmas.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A kapilláris gélelektroforézis (CGE) napjaink egyik legdinamikusabban fejlődő analitikai módszerének tekinthető, leginkább rutinszerűen a gyógyszeripar és az orvosbiológia területén alkalmazzák. A dolgozat első része a téma irodalmi hátterét ismertette. Bemutattam a kapilláris gélelektroforézis legfontosabb elméleti és gyakorlati elveit, a műszerek felépítését, kapilláris bevonati technikákat, valamint a leggyakrabban használt gél töltet típusokat. Részletesen ismertettem néhány detektor típus működési elvét, mint például UV-Vis, dioda soros, lézer-indukált és LED fluoreszcens detektor, stb. Végül egy rövid áttekintést adtam a kapilláris gélelektroforézis legfontosabb alkalmazási területeiről, valamint a legújabb mikrocip alapú (lab-on-a-chip) mikroelektroforetikus elválasztásokról. Fő hangsúlyt a nukleinsavak, a fehérjék és az komplex szénhidrátok vizsgálata képezte.

Ezen irodalmi bevezető után a bemutatásra kerülő munka célkitűzései a következők voltak:

1. A kutatásom első célja volt, eddig kereskedelmi forgalomban nem kapható új, ultragyors, LED indukált fluoreszcens detektorral felszerelt, automatizálható kapilláris elektroforetikus rendszer bevezetése és fejlesztése a bioanalitika területére, amely lehetővé tette akár nagy mintaszámok esetén is a gyors elválasztást. A rendszer megbízhatóságának ellenőrzésére ~1000 darab nagy molekulású genomiális DNS (gDNS) minta tisztaságát és degradációs fokát vizsgáltam. Továbbá a migrációs idő reprodukálhatóság, a kimutatási határ és a detektor linearitás értékeit is meghatároztam összehasonlítva a hagyományos lap gélelektroforézis technikával.
2. A reprodukálhatósági kísérleteket követően haplotipizáló módszerek validálását hajtottam végre a CGE műszeren a WFS1 gén 3' szabályzó régiójában található *rs1046322* és *rs9457* mikro-RNS kötő SNP-k vizsgálatával.
3. A növekvő gliko-biomarker kutatás és terápiás antitestek hatalmas piaca miatt egyre inkább nagy szükség van mesterséges szénhidrát antigének létrehozására. Így a kísérleti munka további célja volt, hogy újszerű szintézismódszert dolgozzak ki a szénhidrátok makromolekuláris hordozókhoz való kovalens kötésére, elektroforetikus analitikai módszereket fejlesszek ki jellemzésükre, valamint elvégezzem a glikokonjugátumok ellen termelt új cukorhoz specifikus kötődő antitestek immunológiai vizsgálatát.

A kidolgozott metodika segítségével így lehetőség nyílik olyan szélesebb spektrumú glikánkönyvtár létrehozására is, amely alapján könnyebben, gyorsabban és olcsóbban lehet különböző betegségeket diagnosztizálni glikozidációs profiljuk alapján.

4. Az értekezés következő részében további célom volt fehérjékhez kapcsolódó *N*-glikán szerkezeti adatbázis kidolgozása egy új, egycsatornás, LED- alapú kapilláris gélelektroforézis készülékhez. 8-aminonaftalin-1,3,6-triszulfonsav (ANTS) fluoreszcens festékkel jelölt *N*-glikán adatbázis ellenőrzését humán immunglobulin G (hIgG) és szarvasmarha ribonukleáz B (RNáz B) glikoproteinekről lehasított szénhidrátokkal végeztem. A téma újszerűségét az adta, hogy a CGE-LEDIF analízisekhez szerkezeti adatbázisok napjainkban nem állnak rendelkezésre, így a migrációs tulajdonságokat tisztított standardok elektroferogramjai alapján vagy más analitikai módszerekkel (NP-HPLC, MS) korrelálva van lehetőség kiértékelni. Viszont a létrehozott adatbázis megkönnyítheti a kutatók további munkáit, mivel nem szükséges nagyszámú standardot minden elemzés során megfuttatni a kiértékeléshez, így a mobilitások alapján a szerkezet azonosítható, elősegítve ezzel a biomarker-kutatást és a gyógyszerfejlesztést.
5. Az értekezés utolsó részében céljaim között szerepelt lineáris láncú, glükóz egységekből felépülő maltooligoszacharid, valamint elágazó láncú, IgG glikoproteinről lehasított komplex *N*-glikán szerkezet-mobilitás összefüggéseinek vizsgálata kapilláris elektroforézissel. A téma újszerűségét az adta, hogy korábbi munkák sem a puffer adalékok (polietilén-oxid, lineáris poliakrilamid, etilén-glikol, stb.), sem pedig az elválasztási hőmérséklet hatásait nem vizsgálták glükóz egységekre (GU) nézve, annak ellenére, hogy ezeket az adatbázis stabilitást jelentősen befolyásoló tényezőknek tekintik.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Vegyszerek

5-amino-2-naftalén-szulfonsav (ANSA), D-(+)-maltóz monohidrát, humán immunglobulin G (hIgG), szarvasmarha ribonukleáz B (RNáz B), etilén-glikol, polietilén-oxid, dithiothreitol, jodoacetamid és minden más vegyszer a Sigma-Aldrich Kft-től (St. Louis, MO, USA) származtak. 8-aminonaftalén-1,3,6-triszulfonsav (ANTS) és az *N*-glikán standard glikánstruktúrákat a Prozyme (Hayward, CA, USA) szolgáltatta. A lineáris poliakrilamid oldatot a Polysciences-től (Warrington, PA, USA) rendeltem. A maltooligoszacharidot és 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonát (APTS) fluoreszcens festéket a SCIEX (Brea, CA, USA) bocsátotta rendelkezésemre. A pufferek elkészítéséhez Millipore Milli-Q (Billerica, MA, USA) ultratiszta vizet használtam, azokat 0,45 µm pórusátmérőjű Acrodisc membránszűrőn (Millipore) szűrtem.

3.2. Nagy molekulásúlyú gDNS minták vizsgálata kapilláris- és hagyományos lap gélelektroforézissel

A gDNS mintákat a Debreceni Egyetem Klinikai Genomikai Központ bocsátotta rendelkezésemre. A kapilláris elektroforetikus elválasztásokhoz 75 – 20 000 bázispár közötti, míg a reprodukálhatósági vizsgálatokhoz 100 – 3 000 bp tartományú DNS létrát (Biocenter, Szeged, Magyarország) használtam. A gDNS minták vizsgálata egy fluoreszcens érzékelővel felszerelt, új DNA-CE kapilláris elektroforézis (BiOptic, New Taipei City, Tajvan) rendszer segítségével történt. Az elválasztások egy 11 cm effektív (15 cm teljes hosszúságú), 75 µm belső átmérőjű (360 µm külső átmérőjű) borítatlan falú szilika kapillárisokban történtek. A fluoreszcens detektáláshoz szükséges gél-puffer etidium-bromid festéket tartalmazott. Az alkalmazott feszültség 533 V/cm (8 kV) volt egy nagyfeszültségű tápegység (EMCO, Sutter Creek, CA, USA) használatával. Az adatok kiértékelésére Q-Analyzer (BiOptic) szoftver szolgált. A lap gélelektroforetikus elválasztásokhoz 75 – 20 000 bp tartományú DNS létrát használtam. A gDNS minták elválasztása egy E-Gel iBas tápegységgel (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Németország), valamint azok valós-idejű detektálása egy kék fényű transzilluminátor (Thermo Fisher Scientific) segítségével történtek. Az előre megöntött gélek 2 % agarózt és etidium-bromidot tartalmaztak. Az adatok kiértékelésére egy kamerával felszerelt (C-4000ZOOM, Olympus, Budapest, Magyarország) képelemző szoftver (Alpha DigiDoc AD-1201, Bio-Science, Budapest, Magyarország) szolgált.

3.3. Molekuláris haplotipizálás

3.3.1. Allél-specifikus PCR

A gDNS mintákat a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet bocsátotta a rendelkezésemre. A vizsgálat protokollját az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásaitikai Bizottság (ETT-TUKEB ad.328/KO/2005, ad.323-86/2005-1018EKU) hagyta jóvá. A gDNS minták egészséges önkéntesektől származtak, a minták begyűjtése non-invazív (szájnyálkahártyán) módon történt, azok tisztítása a cég által ajánlott protokollt követve zajlott. Az egyponyos nukleotid polimorfizmusok (*rs1046322* és *rs9457* SNP) amplifikációja allél-specifikus PCR módszer használatával történt. A PCR-hez a HotStarTaq DNS polimeráz kitet alkalmaztam, követve a cég által ajánlott protokollt (Qiagen, Valencia, CA, USA). A reakcióelegy 10 µl térfogatban zajlott és az alábbi összetevőket tartalmazta: 4 ng gDNS, 0.5 U HotStarTaq DNS polimeráz, 1× PCR puffer, 1× Q oldat, 200 µM dATP, dCTP, dGTP és dTTP, 1 µM a szenz és antiszenz primerek (Sigma Genosys, Woodlands, TX, USA). A primer szekvencia megtervezésére az Oligo 5.0 verzió szolgált (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA). A PCR termociklus első lépése egy kezdeti denaturáció volt 95 °C-on 15 percen át, ez a lépés a DNS-polimeráz aktiválása miatt volt szükséges. Ezután következett 40 ciklus 3 lépésből: 94 °C – 30 sec denaturálásból, 55 °C – 30 sec anneálásból és 72 °C – 1 min extenzióból állt, majd egy 10 perces 72 °C-os végső extenziós lépés zárta a reakciót. Az elkészült termékeket a PCR készülék 8 °C-on tartotta a további felhasználásáig.

3.3.2. PCR-termékek vizsgálata agaróz lap gélelektroforézissel

Ezután a PCR-termékeket (~ 20 ng) 2 %-os agaróz gélen választottam el, a futtatás időtartama 45 perc, az alkalmazott feszültség 110 V volt. Az elválasztáshoz 100 – 1 000 bp tartományú DNS létrát használtam kontrollnak (Thermo Fisher Scientific). A 2 %-os agaróz gél etidium-bromidos (0.5 µg/ml 1 x TAE oldatban) festéket tartalmazott. A fényképezés UV fény alkalmazásával történt Gel-Doc XR gél dokumentációs berendezés (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segítségével.

3.3.3. PCR-termékek vizsgálata kapilláris gélelektroforézissel

A PCR termékek vizsgálata egy fluoreszcens detektorral felszerelt, új DNA-CE kapilláris elektroforézis rendszerrel (BiOptic) történt. Az elválasztások egy 11 cm effektív (15 cm teljes hosszúságú) 75 µm belső átmérőjű (360 µm külső átmérőjű) borítatlan falú szilika kapillárisokban történtek. Az elválasztásokhoz molekulásúly markereket (20 bp és 5000 bp, BiOptic) használtam,

hogy javítsam a mérések pontosságát. A mintainjektálás elektrokinetikusan történt, az alkalmazott feszültség 400 V/cm (6 kV) volt. Az adatok kiértékelésére Q-Analyzer (BiOptic) szoftver szolgált.

3.4. Egerek immunizálása mesterséges szénhidrát antigénnel

3.4.1. Neoglikoproteinek szintézise

Acetilációs lépés: Kereskedelmi forgalomban kapható maltóz hidroxil csoportjait acetileztem nátrium-acetáttal és ecetsavanhidriddel, amely reakció a peracetilezett 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glükopiranozil-(1 \rightarrow 4)-1,2,3,6-tetra-O-acetil- β -D-glükopiranoz vegyületet eredményezte.

Védőcsoport-eltávolítási lépés: a következő lépésben az anomer acetil csoportot távolítottam el hidrazin-acetáttal és a képződött 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glükopiranozil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glükopiranoz hemiacetált triklór-acetimidát donorrá alakítottam át izzított kálium-karbonát jelenlétében. Az anomer (α , β) konfigurációt NMR készülékkel ellenőriztem. **Spacer**

hozzáadási lépés: a glikozil-donort tisztítás nélkül reagáltattam a 7-(1,3-dioxán-2-il)-heptán-1-ollal, ezzel kialakítva a formil-heptil aglikonnal rendelkező maltóz származékot. **Konjugálási**

lépés: A konjugálási lépés előtt eltávolítottam a vegyületről az acetil védőcsoportot, savas hidrolízissel. Ezután a képződött aldehidet redukzív aminálással hozzákapcsoltam a BSA-hoz, melynek során a maltóz származék szabad aldehid csoportját reagáltattam a BSA lizin egységeinek ϵ -amino csoportjaival, majd a képződő Schiff-bázist NaCNBH₃-val redukáltam, így nyertem a stabil szekunder amin, azaz a neoglikoproteint, mesterséges szénhidrát antigént. A konjugálási reakciót a BSA mennyiségéhez képest különböző szénhidrát felesleg alkalmazása esetén valósítottam meg, ezzel megkaptam a BSA-32-maltóz, a BSA-50-maltóz, a BSA-59-maltóz és a BSA-66-maltóz konjugátumokat.

3.4.2. Neoglikoproteinek vizsgálata SDS-CGE és MALDI-TOF MS műszerekkel

A redukzív aminálással előállított szénhidrát antigének tisztaságának és homogenitásának meghatározása egy lézer alapú fluoreszcens detektorral felszerelt, kapilláris elektroforézis rendszerrel (P/ACE MDQ, SCIEX) történt. Az elválasztások egy 10 cm effektív (30 cm teljes hosszúságú), 75 μ m belső átmérőjű (360 μ m külső átmérőjű) borítatlan falú szilika kapillárisokban történtek, a neoglikoproteinek elválasztására kifejlesztett pufferral (SDS-MW, SCIEX). Az alkalmazott feszültség 500 V/cm (15 kV) volt. A MALDI MS méréseket Bruker gyártmányú BIFLEX IIITM típusú, repülési idő (TOF) tömeganalizátorral felszerelt, valamint

pozitív reflektoronnal ellátott tömegspektrométeren végeztem. A mintamolekulák gáz fázisba juttatása és ionizálása nitrogén lézer ($\lambda = 337 \text{ nm}$), valamint 3ns impulzusidő alkalmazásával történt. Többszöri, általában 100-nál több impulzust használtam 19 kV gyorsító és 20 kV reflektoron feszültség mellett.

3.4.3. Neoglikoproteinek vizsgálata ELISA teszttel

A szénhidrát specifikus antitestek kimutatásához, a legkisebb (32 szénhidrát egység/mol) és a legnagyobb (66 szénhidrát egység/mol) cukorszámmal rendelkező szénhidrát antigéneket kísérleti egerekbe (BALB/c, ♀) juttattam, majd a vérmintából nyert szérumot ELISA teszttel vizsgáltam. Röviden, a megszintetizált szénhidrát antigéneket mikrotiter lemez felületéhez kötöttem, majd 37 °C-on 1 óráig inkubáltam. Az antigén mennyiségének optimalizálásához 10 µg/ml, és felező hígításokat (1,25 – 0,08 µg/ml) használtam. Míg az inhibíciós vizsgálatokhoz 0,2 µg/ml BSA és 0,2 µg/ml szénhidrát antigéneket alkalmaztam BSA, BSA-32-maltóz és BSA-66-maltóz inhibitor jelenlétében (0,1 – 1,6 µg/ml). A nem kötődött antigéneket mosással eltávolítottam és az aspecifikus kötőhelyeket blokkoltam PVP-blokkoló pufferrel, majd inkubáltam 37 °C-on 30 percig. A mosási lépés után az egerből nyert szérum mennyiségének az optimalizálásához először 1 000 – 128 000-szeres hígítást használtam a 10 µg/ml antigén felületi kötődés esetében, míg 4 000-szeres szérum mennyiséget alkalmaztam felező hígítások és inhibíciós kísérletek számára. Ezt követte 1 óra inkubáció 37 °C-on. Mielőtt a második HRP- enzimmel jelzett immunglobulin (IgG) antitestet hozzáadtam volna az immunkomplexhez, a mikrotiter lemezt 4× mostam mosó pufferrel, majd 1 óráig inkubáltam 37 °C-on. A következő 4 mosási lépés után, a mintákat TMB szubsztrát oldattal kezeltem 10-15 percig, a reakció leállítása után az így kialakult színintenzitást 450 nm-en ELISA leolvasó (Multiscan Ascant, Thermo Fisher Scientific, Hudson, NH, USA) segítségével mértem.

3.5. Szénhidrát-szerkezeti adatbázis létrehozása kapilláris gélelektroforézissel

3.5.1. Minta-előkészítés az elektroforetikus elválasztáshoz

A glikoproteinek emésztéséhez (50 µg humán IgG és szarvasmarha RNáz B) a GlykoPrep kittedt használtam, követve a cég által ajánlott protokollt (Prozyme). A maltodextrin létra, a D-(+)-maltóz monohidrát, a szabad *N*-glikán szerkezetek és a cukor standardok fluoreszcens jelölése egy redukív aminálási lépésben történt ANTS festék ($\lambda_{\text{ex}} 356 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} 512 \text{ nm}$) hozzáadásával, majd

egy éjszakán keresztül inkubáltam 37 °C-on. A jelölt mintákat CU töltetekkel (Prozyme) tisztítottam meg a szabad festék és a sótartalom eltávolítás érdekében.

3.5.2. Glikánok elválasztása kapilláris gélelektroforézissel

A szénhidrátok vizsgálata egy fluoreszcens detektorral felszerelt (excitáció/emisszió: 350–390 nm), új kapilláris elektroforézis rendszerrel (GL1000, BiOptic) történt. Az elválasztások egy 11,5 cm effektív (15,5 cm teljes hosszúságú), 50 µm belső átmérőjű (360 µm külső átmérőjű) N-CHO kapillárisokban történtek, az *N*-glikánok elválasztására kifejlesztett géllal és pufferral (BiOptic). Az elválasztásokhoz molekulásúly markereket (ANTS-G2 és ANSA-G2) használtam, hogy javítsam a mérések pontosságát. Az alkalmazott feszültség 387 V/cm (6 kV) volt. Az adatok kiértékelésére Q-Analyzer (BiOptic) szoftver szolgált. Röviden, a kapott migráció időket relatív migrációs időkké számítottam át a molekulásúly markerek használatával. Az *N*-glikánokat glükóz egységekből álló oligoszacharid létrával összevetve, az analízis után a skáláról interpolálva minden egyes csúcshoz hozzárendeltem egy megfelelő glükóz egységet (GU).

3.6. Hőmérséklet és háttélektrolit-összetétel változtatásának hatása a szénhidrátok elválasztására

3.6.1. Minta-előkészítés az elektroforetikus elválasztáshoz

A glikoprotein mintáról (hIgG) redukálást (50 mM dithiothreitol, 65 °C 15 perc) és alkilálást követően (50 mM jodoacetamid, 37 °C 30 perc), nátrium-bikarbonát puffer és PNGáz F (Prozyme) enzim hozzáadásával történt meg az *N*-glikánok lehasítása egy éjszakás 37 °C-os inkubálás során. A tisztításhoz karboxil típusú mágneses gyöngyöket (SCIEX) használtam. A lehasított glikánok beszárítása vákuum-centrifugában történt, amit APTS fluoreszcens jelölés követett 50 °C-on 1 órán keresztül. A jelölt mintákat mágneses gyöngyökkel tisztítottam meg a szabad festék és a sótartalom eltávolítás érdekében. A 20 – 50 °C-os háttélektrolit oldatok viszkozitásának méréséhez egy beépített hűtő/fűtő lemezzel rendelkező AR 550 típusú reométer készüléket használtam (TA Instruments, New Castle, Németország).

3.6.2. Lineáris és elágazó láncú szénhidrátok elektroforetikus vizsgálata

Az APTS jelölt szénhidrátok vizsgálata egy fluoreszcens detektorral (λ_{ex} 488 nm és λ_{em} 520 nm) felszerelt PA 800 Plus (SCIEX) kapilláris elektroforézis készülék segítségével történt.

Az elválasztások egy 21 cm effektív (31 cm teljes hosszúságú), 50 µm belső átmérőjű (360 µm külső átmérőjű) N-CHO kapillárisokban történtek. A készülék beépített hűtő rendszert tartalmazott, hogy enyhítsem a hőmérséklet-változásból esetlegesen származó hibákat. Az *N*-glikánok elválasztása 20 – 50 °C-on történt, az alábbi pufferekkel és gélekkel kiegészítve: i) 25 mM lítium-acetát (pH: 4.75), ii) 25 mM lítium-acetát (pH. 4.75) + 0 – 60 % etilén-glikol, iii) 25 mM lítium-acetát (pH: 4.75) + 0 – 3.0 % lineáris poliakrilamid (MW 10,000), iv) 25 mM lítium-acetát (pH: 4.75) + 0,4 % 300 kDa polietilén-oxid. Az alkalmazott feszültség 400 V/cm (12 400 V) volt, katódos injektálással és anódos detektálással. A minták injektálása nyomással történt, 0,5 psi (3,445 kPa) 5 másodperc időtartammal. APTS jelölt maltózt (APTS-G2) használtam belső standardként minden egyes mintainjektáláshoz. A relatív migrációs időket és a GU értékeket a fent említett módon határoztam meg. A glükóz egységekből felépülő oligoszacharid létra (DP 7-12) és az IgG *N*-glikánok (FA2, FA2[6]G1, FA2[3]G1, és FA2G2) hidrodinamikai térfogatát a TURBOMOLE 6.3 verziójú (COSMOlogic GmbH, Leverkusen, Németország) kvantumkémiai programmal számoltam ki.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Nagy molekulású gDNS minták vizsgálata kapilláris- és hagyományos lap gélelektroforézissel

Az értekezés első részében egy új, egycsatornás, LED- alapú fluoreszcens detektorral felszerelt, kapilláris gélelektroforézis műszer került bevezetésre. Megbízhatóságának ellenőrzésére nagyszámú (~1000 darab) gDNS minta tisztaságát és degradációs fokát vizsgáltam kvantitatív PCR-hoz való minta-előkészítéshez és teszteltem a rendszer reprodukálhatóságát. A méret meghatározására a kapilláris elektroforetikus elválasztásokhoz 75 – 20 000 bázispár közötti DNS létrát használtam. Intakt, nem-degradált gDNS minta 2 000 bázispár körüli tartományban mutatott elektroforetikus mintázatot, míg a degradált gDNS minta az alacsonyabb bázispár körüli régióban (~0 – 100 bp) volt megfigyelhető. Összehasonlítva a hagyományos lap gélelektroforézis módszerrel, a degradált gDNS minták 2 % agaróz gélen nem voltak láthatóak, míg az összes degradált gDNS minta egyértelműen kimutatható volt CGE elválasztással. A CGE reprodukálhatósági vizsgálatokhoz 100 – 3 000 bp tartományú DNS létrát használtam. Ennek átlagos migrációs ideje 88,22 – 143,22 másodperc közé esett, relatív szórása (RSD%) 0,5118 – 0,7477 % között volt, azaz kiváló reprodukálhatósági paramétereket mutatott.

4.2. Molekuláris haplotipizálás

A dolgozatom második részében, a reprodukálhatósági kísérleteket követően, haplotipizáló módszerek validálását végeztem el a kapilláris gélelektroforézis műszeren a WFS1 gén 3' szabályzó régiójában található *rs1046322* és *rs9457* mikro-RNS kötő genetikai variánsok vizsgálatával. Az irodalomból jól ismert, hogy a wolframin az endoplazmatikus retikulumban (ER) található olyan transzmembrán fehérje, amely nagy mennyiségben a hasnyálmirigy béta-sejtjei és a központi idegrendszer neuronjai által termelődik. A WFS1 génben kialakult mutációk Wolfram szindrómát (ún. kétoldali látóideg sorvadást) okoznak, melynek gyakran társulnak fiatalkori nem autoimmun eredetű diabettessel együtt járó progresszív neurodegeneratív betegségekkel.

A genetikai variánsok molekuláris haplotipizálása allél-specifikus amplifikációs módszerrel (ASA), majd kapilláris gélelektroforézissel történt, amely gyors és megbízható genetikai adatokat nyújtott bármely egy pontos-nukleotid polimorfizmusról (SNP). A *rs9457* és *rs1046322* polimorfizmusok feltehetően olyan miR-SNP-k, amely a WFS1 gén 3' UTR régiójában helyezkednek el. A genetikai variánsok kromoszómális lokalizációjának meghatározásához egy szenz *rs1046322* és egy antiszenz *rs9457* specifikus primert használtam a PCR kísérletekben. Haplotipizáláskor, az „egycsöves” reakció ugyanazon a lókuszon egy allél vizsgálatára, azaz egy haplotípus kombináció meghatározására alkalmas, míg következésképpen „kétcsöves” reakció szükséges a teljes genotípus és haplotípus vizsgálatához. A „kétcsöves” amplifikációs módszerrel létrehozott haplotípusok bázispár méretét kapilláris gélelektroforézissel és hagyományos lap gélelektroforézissel határoztam meg. A méret meghatározására a kapilláris elektroforetikus elválasztásokhoz 50 – 3 000 bázispár közötti DNS létrát használtam. Az elválasztásokhoz kettő molekulasúly markert (20 bp és 5000 bp) alkalmaztam, hogy javítsam a mérések pontosságát. Az első „kétcsöves” amplifikációs kísérletből származó 454 bp, 500 bp és 583 bp dupla-szálú DNS (dsDNS) fragment kapilláris elektroforézissel mért és számolt értékeire a következőt kaptam: 437, 488 és 541 bp. Míg a második „kétcsöves” amplifikációs kísérletből származó 399, 457, 504 és 591 bp dsDNS fragment kapilláris elektroforézissel mért és számolt értékeire pedig a következőt kaptam: 384, 437, 488 és 541 bp, amely 95%-nál nagyobb pontosságot mutatott.

Ezenkívül a CGE-LEDIF igen hatékony, gyors analízist tett lehetővé, gyakran 4 percnél is rövidebb elválasztásokkal, valamint pontos mPCR minta bázispár értékeinek kalkulálásával (2,4 – 9,2%). Továbbá annak érdekében, hogy meghatározzam a kapilláris elektroforézis műszer kimutatási határ és a detektor linearitási értékeit, egy 576 bp-os WFS1 PCR-fragment

használtam. A készülék érzékenysége hígító pufferben 0,08 ng/μl és desztillált vízben 0,002 ng/μl volt. Fontos megjegyezni, hogy injektálásakor a vízben hígított PCR minták sokkal nagyobb mintabevitelt eredményeztek, mivel a puffer-ionok nem versenyeznek a mintamolekulákkal, így nagyobb érzékenységet tudtam elérni. Ezzel szemben a pufferrel történt mintahígítással pontosabb CGE méréseket lehetett kapni. A detektor linearitási értékek meghatározásakor egy lineáris detektor választ kaptam 0,08 – 10,0 ng/μl közötti koncentráció tartományban, melynek értéke $R^2=0.9997$ volt.

4.3. Mesterséges immunizáció szénhidrát antigénekkal

Napjainkban a szénhidrát-specifikus antitestek vizsgálata igen fontos szerepet játszik a gliko-biomarker kutatás területén, mivel ezeket az antitesteket, mint diagnosztikai markert (pl. neoglikoprotein-alapú antibakteriális és antitumor vakcinák, stb.) használják a betegségek diagnosztizálására. A szénhidrát antigének mesterséges szintézise kétféleképpen történhet: a glikánok véletlenszerűen vagy meghatározott ponton (pl. hídmolekulán keresztül) kapcsolódnak a hordozó fehérjéhez, ezzel kialakítva a kovalens kötést az oligoszacharid redukáló vége és a fehérje aminos csoportjai között.

Az értekezés következő részében célul tűztem ki kereskedelmi forgalomban kapható maltóz marha szérum albuminhoz (BSA) történő konjugálását redukatív aminálással. A BSA-t, mint hordozó fehérjét azért választottam, mivel természetes formában a glikozilációs módosításoktól mentes. Annak érdekében, hogy megőrizsem a maltóz szerkezetet, a szénhidrátot formil-heptil [7-(1,3-dioxán-2-il)-heptán-1-ol] hídmolekulán keresztül kapcsoltam hordozó fehérjéhez. A fehérje mennyiségéhez képest különböző mennyiségű szénhidrát felesleg alkalmazása esetén valósítottam meg a konjugálást és a kapott neoglikoproteinek molekulatömegét MALDI-TOF tömegspektrométerrel határoztam meg. Végezetül az eredményekből meghatároztam a hordozó fehérjére felvitt kötött szénhidrát egységek (32, 50, 59 és 66 szénhidrát egység/mol) számát. Ez az eredmény a hordozó fehérje 60 szabad aminos csoport esetében meglepő lenne, de *Schwartz* és munkatársai részletes vizsgálatai kimutatták, hogy szekunder aminokon kívül tercier aminok is keletkeznek redukatív amináláskor. Továbbá a reakciótermékek tisztaságát és homogenitást SDS-alapú kapilláris gélelektroforézissel is vizsgáltam. Az eredmények azt mutatták, hogy minél több szénhidrát egységet sikerült hordozó fehérjéhez kapcsolni redukatív aminálással, annál kisebb volt a jelintenzitás és annál tovább tartott a minták elválasztása. Ennek az az egyszerű oka, hogy kevesebb festék tudott hozzákötődni a fehérje még megmaradt szabad aminos csoportjaihoz. Ezután a legkisebb (32 szénhidrát egység/mol) és a legnagyobb (66 szénhidrát egység/mol)

cukorszámmal rendelkező szénhidrát antigént kísérleti egerekbe (egértörzs: BALB/c) juttattam és a szénhidrát specifikus antitestek kimutatásához a kinyert vérmintából származó szérumot (10 µg/ml) indirekt ELISA kísérletekkel vizsgáltam. Az eredmények azt mutatták, hogy immunizálást követően a magasabb szénhidrát tartalmú antigénekre jóval nagyobb immunválasz jött létre, azaz több IgG poliklonális antitest termelődött, mint az alacsonyabb cukorszámú glikokonjugátum ellen. Ha az antigén mennyiségét lecsökkentettem felező hígításban (1,25 – 0,08 µg/ml), akkor nagyobb immunválasz jött létre a neoglikoproteinekre, mint a hordozó fehérjére. Másrészt, nem történt IgG antitesttermelés maltóz és egyéb cukrok, mint például glükóz, izomaltóz, laktóz, galaktóz és maltodextrin inhibitorok hozzáadásával.

Az elért eredmények azt mutatják, hogy a makromolekuláris hordozóhoz kötött szénhidrát molekulák olyan specifikus epitópokat tartalmaznak, amelyek egyediek és alkalmasak specifikus ellenanyag termelésének kiváltására.

4.4. Szénhidrát-szerkezeti adatbázis létrehozása kapilláris gélelektroforézissel

A biofarmakológia terápiás glikoproteinek iránt támasztott igényei megkövetelik a nagy felbontású, reprodukálható analitikai módszerek bevezetését a glikozilációs vizsgálatokhoz. A kapilláris gélelektroforézis nagy érzékenységgű, robusztus és megbízható eszköz a glikánok mélyreható szerkezeti jellemzésére a biomedicina és a gyógyszeripar területein egyaránt. Az időigényes exoglikozidázos glikánszekvenáló lépések helyett, a szerkezeti adatbázisok megkönnyíthetik a kutatók munkáját, mivel nem szükséges nagyszámú standardot minden elemzés során megfuttatni a kiértékeléshez. Ugyanakkor a módszer specifikus az adott készülékre és gél-puffer rendszerre.

A dolgozat negyedik részében komplex cukrokhoz kapcsolódó ANTS fluoreszcens festékkel jelölt *N*-glikán adatbázis került bevezetésre egy új, egycsatornás, LED- alapú kapilláris gélelektroforézis készülék használatához. Az adatbázis egy egyszerű és hatékony módja a gyors szerkezeti értékelésnek, melynek alapja ismeretlen glikoproteinekből származó *N*-glikánok relatív migrációs idejéből számolt GU értékek összehasonlítása a standardok GU értékeivel. Az ANTS jelölt *N*-glikán adatbázis jelenleg 25 oligoszacharidot tartalmaz, ezek többnyire a gyógyszeripar területén használt, azaz terápiás antitestek *N*-glikozilációs szerkezeti vizsgálataihoz szükségesek. Az átfogó *N*-glikán adatbázis létrehozásakor először a glikán standardokat redukív aminálással ANTS fluoreszcens festék segítségével megjelöltem, majd megtisztítottam a szabad festék és a sótartalom eltávolítás céljából. Ezek után megmértem egyesével a mintákat a kapilláris

gélelektroforézis készüléken. Végül a normalizált migrációs időket és a GU értékeket meghatároztam az anyagok és módszerek című fejezetben leírtaknak megfelelően. Az elválasztásokhoz molekulásúly markereket (ANTS-G2 és ANSA-G2) használtam, hogy javítsam a mérések pontosságát. Az adatbázis tartalmazza az glikán standardok nevezékatanát, grafikus ábrázolását, pontos molekulatömegét, GU értékét valamint a szórási értékeket.

Az adatbázis ellenőrzését humán immunglobulin G és szarvasmarha ribonukleáz B glikoproteinekről endoglikozidáz enzimmel lehasított *N*-glikánokkal végeztem el. Röviden, a glikoproteinekről először endoglikozidáz PNGáz enzim segítségével leemésztettem a *N*-glikánokat, a szénhidrátokat redukív aminálással ANTS fluoreszcens festék segítségével megjelöltem, majd megtisztítottam a szabad festék és a sótartalom eltávolítás céljából. Ezek után a mintákat a szénhidrátok meghatározására szolgáló kapillaris gélelektroforézis készüléken vizsgáltam. Az eredmények azt mutatták, nagyon kis különbség mutatkozott a glikoproteinekből származó *N*-glikánok és a standard *N*-glikánok GU értékei között (hIgG: <0.14 GU, RNáz B: <0.13 GU). A jövőben az így kapott GU eredményeket, mint referencia értékeket alkalmazni lehet a gyors szerkezeti vizsgálatokhoz az ismeretlen *N*-glikán minták esetében is.

4.5. Hőmérséklet és háttérelektrolit-összetétel változtatásának hatása a szénhidrátok elválasztására

Dolgozatom utolsó részében lineáris, glükóz egységekből felépülő maltooligoszacharid, valamint elágazó láncú – IgG glikoproteinről lehasított – komplex *N*-glikán szerkezetek elektroforetikus mobilitásainak változásait vizsgáltam kapillaris elektroforézissel. Különböző hőmérsékleten (20 – 50 °C) és eltérő összetételű puffer rendszerekkel (pl. 0 – 60 % etilén-glikol, 0 – 3,0 % lineáris poliakrilamid és 0,4 % 300 kDa polietilén-oxid) tanulmányoztam az APTS-el jelölt *N*-glikánok vándorlásait.

A lineáris poliakrilamid lánc-átfedő tulajdonsága 1,5 %-os koncentrációnál valósult meg, így az alatti (0 %, 0,5 % és 1,0 %) és feletti (2,0 % és 3,0 %) koncentrációkat vizsgáltam. Az aktiválási energia (E_a) polimerizációs fok (DP) függvényében való ábrázolásának eredményei azt mutatták, hogy a maltooligoszacharid DP7 (maltoheptóz) fokánál egy töréspont keletkezett a magasabb lineáris poliakrilamid koncentrációnál. Ennek a magyarázata, hogy a maltooligoszacharid konformációja megváltozott, azaz véletlenszerűen tekeredő (DP <7) szerkezetből megnyílt hélix (DP > 7) struktúra alakult ki. A konformáció változás oka, hogy a maltoheptóz (DP 2–7) polimerizációs fokig az aktiválási energia glükóz egységenként 212 J/mol értékkel növekedett,

míg a feletti (DP 7–15) növekedés lényegesebb kisebb (68 J/mol) volt. A drasztikus E_a különbség (144 J/mol) oka, hogy az maltooligoszacharid DP7 alatt kevesebb hidrofíl tulajdonsággal rendelkezett, így jobban kapcsolatba tudott kerülni a lineáris poliakrilamid láncsal $-(\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CO}-\text{NH}_2)-\text{CH}_2)-\text{LPA}$, amely magasabb E_a szintet eredményezett. Míg a magasabb (2,0 % és 3,0 %) lineáris poliakrilamid koncentráció esetében az átlapolás emelkedésével kevesebb szabad lineáris poliakrilamid lánc maradt, amely kapcsolatba tudott volna kerülni az oldott cukrokkal, ezáltal az E_a csökkent. Azonban a teljes (0 – 3,0 %) lineáris poliakrilamid tartományban az E_a értékek pozitívak voltak, ami arra utal, hogy nem történt minta/mátrix deformáció. Továbbá, megfigyeltem, hogy azonos viszkozitási értékek mellett, az oligoszacharid (DP 2–7) E_a értéke 72 J/mol és 212 J/mol volt 10%-os etilén-glikol és 2%-os lineáris poliakrilamid tartalmú gél-puffer rendszereknél. Viszkozitási értékeik a következők voltak: 10 % EG (20°C) = 1.28 mPa.s; 10 % EG (50 °C) = 0.74 mPa.s; 2 % LPA (20 °C) = 1.30 mPa.s; 2 % LPA (50 °C) = 0.82 mPa.s. Ez a drasztikus különbség (140 J/mol) az oldott anyag és oldat között fellépő kölcsönhatással magyarázható. Az oligoszacharid DP > 7 feletti E_a értékei nagyon hasonlóak voltak (72 vs. 68 J/mol) viszkozitást módosító puffer rendszerekben, amely arra utal, hogy a kialakult hélix struktúra csökkenti a minta/mátrix kölcsönhatásokat.

Ezenkívül, további eredmények azt mutatták, hogy ha a háttérelktrolit oldathoz (25 mM lítium acetát, pH: 4.75) viszkozitás növelő etilén-glikolt adtam vagy anélkül történt a mérés, CGE elválasztáskor a – kétantennás IgG glikoproteinről lehasított – *N*-glikánok GU értéke csökkent a hőmérséklet emelésével (20 – 50 °C). Azaz, 25 mM lítium-acetát valamint 10 % etilén-glikol + 25 mM lítium acetát oldatban az IgG *N*-glikán GU értékei átlagosan –0.89 GU-al és –0.39 GU-al változtak a hőmérséklet növelésének hatására. Azonban, ha a háttérelktrolit oldat lineáris poliakrilamidot vagy polietilén-oxidot tartalmazott, az *N*-glikánok GU értéke nőtt a hőmérséklet emelésével (20 – 50 °C). Azaz, 2 % lineáris poliakrilamid és 0.4 % polietilén-oxid tartalmú elektrolit oldatban az IgG *N*-glikán GU értékei átlagosan +0,23 GU-al és +0,38 GU-al változtak a hőmérséklet emelésének hatására. Ez esetben ennek valószínűsíthető oka, a minta és a gélben levő polimerláncok közötti kölcsönhatás vagy a viszkozitásból eredő deformációs hatások. Az E_a ábrázolásával a hidrodinamikai térfogat függvényében, az E_a változásra a különböző puffer-rendszerekben (EG, LPA és PEO) eltérő eredményeket kaptam lineáris és elágazó láncú cukor struktúrákat esetén: 0,3 J/mol és 0,9 J/mol per Å^3 (EG); 0,4 J/mol és 1,0 J/mol per Å^3 (LPA); 0,06 J/mol és 0,3 J/mol per Å^3 (PEO). Az eredmény igazolja, hogy polimer adalék hozzáadásával az oldott minta és polimer láncok között, fizikai kölcsönhatás és egyéb deformációs hatások történhetnek.

5. MEGBESZÉLÉS

Nagy molekulásúlyú gDNS minták vizsgálata kapilláris gélelektroforézissel

A legtöbb bioanalitikai laboratórium a mai napig a hagyományos lap gélelektroforetikus technikát alkalmazza a DNS tulajdonságainak meghatározásához. Azonban a módszer idő- és munkaigényes, emellett kis elválasztási hatékonysággal rendelkezik és nehezen automatizálható. Ötvözve a fluoreszcens detektor érzékenységét a könnyen kicserélhető puffer-rendszerek variálhatóságával, valamint a mérés és a kiértékelés teljes automatizálhatóságával, a kapilláris gélelektroforézis helyettesítheti a hagyományos lap gélelektroforézis technikát. A dolgozatom első részében az együttműködő partnereink segítségével célul tűztem ki egy új, egycsatornás, LED fluoreszcens detektorral felszerelt, ultragyors kapilláris gélelektroforézis rendszer bevezetését, amely lehetővé tette akár 96 minta gyors analizését is. A kapilláris elektroforetikus készülék megbízhatóságának ellenőrzésére ~1000 darab gDNS minta tisztaságát és degradációs fokát vizsgáltam, amely lehetőséget nyújtott a degradált és intakt gDNS minták gyors elkülönítésére. A tisztaságelemzés mellett a rendszer ismételtetésének ellenőrzésére migrációs idő szerinti reprodukálhatósági vizsgálatokat végeztem, melynek eredménye kiváló paramétereket mutatott (relatív szórás <0,75 %), ~0.1 ng/μL kimutatási határértékkel. A kapott eredmények fontos információkat nyújtottak a későbbi kvantitatív PCR vizsgálatokhoz, ahol az ép, nem degradált DNS minták kulcsfontosságúak voltak.

Molekuláris haplotipizálás kapilláris gélelektroforézissel

A wolframin az ER-ben található olyan transzmembrán fehérje, amely nagy mennyiségben a hasnyálmirigy béta-sejtjei és a központi idegrendszer neuronjai által termelődik. A WFS1 génben található genetikai variációk hozzájárulhatnak a Wolfram szindróma és 2. típusú cukorbetegség kialakulásához. A többszörös polimorfizmus egyidejű tanulmányozása (pl. haplotipizálás) egyre inkább lehetővé teszi az összetett betegségek genetikai variációinak felderítését. A molekuláris haplotipizálás segítségével meghatározható a két allél relatív kromoszómális elhelyezkedése, ezáltal jobban megérthető a szomszédos SNP-k biológiai hatása is. Munkacsoportunk korábban már sikeresen kidolgozott egy molekuláris geno- és haplotipizáló módszert dopamin D4 receptor génre lézer-indukált fluoreszcens detektor használatával. Azonban a legtöbb laboratóriumban jelenleg még nem áll rendelkezésre érzékeny, ultragyors és LED indukált molekuláris haplotipizálási technika, amely segítségével a haplotípus egyértelműen meghatározható.

Ezért a dolgozatomban második részében a reprodukálhatósági kísérleteket követően haplotipizáló módszerek validálását végeztem el a CGE-LEDIF műszeren a WFS1 gén 3' szabályzó régiójában található *rs1046322* és *rs9457* mikro-RNS kötő SNP-k használatával. A készülék elválasztási hatékonyságát a gyors elemzési idő (< 240 s), a pontos mPCR bázispár értékeinek meghatározása (2.4 – 9.2 %), valamint 0,08 – 10,0 ng/μl közötti koncentráció tartományban a kítő detektor linearitási értékek ($R^2 = 0.9997$) jellemezték. A készülék érzékenysége 0,002 ng/μl volt, desztillált vízben hígított mintára nézve. A CGE-LEDIF készülékkel kidolgozott haplotipizálási metodika nagyszámú klinikai minta vizsgálatára is alkalmas lehet.

Mesterséges immunizáció szénhidrát antigénekkkel

Napjainkban az antiglikán antitestek előállítása egyre nagyobb jelentőséggel bír a glikozilációs markerek felderítésében. Így a dolgozatomban következő részében célul tűztem ki néhány cukorhoz specifikusan kötődő antitest termeltetését egerekben és azok vizsgálatát immunkémiai módszerrel. Az eredmények jól tükrözték a szelektív ellenanyag kötődést a különböző glikozidációs fokkal rendelkező szénhidrát antigénekhez. Másrésztől, a szénhidrát specifikus antitest termelődését szintén alátámasztotta, hogy maltóz és egyéb cukrok (pl. glükóz, izomaltóz, galaktóz, laktóz és maltodextrin) ellen immunválasz nem jött létre. További lépésben meg kellett határozni, hogy vajon egy új immunogén epitóp alakult ki a mesterséges szénhidrát antigéneken, vagy csupán a cukorkonjugálási lépéskor a polipeptid láncon létrejött konformáció-változás idézte elő az immunválasz kialakulását. Azonban irodalmi ismeretek alapján, nem találtam olyan glikozilációs hatást, amely a BSA alapfehérje szerkezetében konformáció-változást okozna. A jövőben a kidolgozott metodika segítségével lehetőség nyílik bonyolultabb betegségekre specifikus antiglikán antitest létrehozására is, amely alapján könnyebben, gyorsabban és olcsóbban lehet a betegségeket glikozidációs profiljuk alapján diagnosztizálni.

Szénhidrát-szerkezeti adatbázis létrehozása kapilláris gélelektroforézissel

Napjainkban a gliko-biomarker kutatás egyre nagyobb teret nyer és a terápiás antitestek felhasználása is széleskörű, melyek előírják a nagy mintaszámot gyorsan analizáló, megbízható és precíz bioanalitikai eljárások alkalmazását. Az elválasztástechnikában is fontos szerepet játszó kapilláris elektroforézis technikával a glikánok szerkezetének meghatározására is lehetőség nyílik. Azonban, a CGE-LEDIF elválasztásokhoz napjainkban adatbázisok nem állnak rendelkezésre, amelyek nemcsak a kutatók munkáját, de a betegségek kialakulásáért felelős szénhidrát szerkezeti variánsok felderítésében is segíthet. Az értekezés következő részében célul

tűztem ki egy ANTS fluoreszcens festékkel jelölt *N*-glikán GU adatbázis bevezetését egy új, egycsatornás, LED- alapú elektroforetikus készülék használatához. Fontos megjegyezni, hogy munkacsoportunk korábban már bevezetett egy APTS fluoreszcens festékkel jelölt GU adatbázist lézer-indukált fluoreszcens detektáláshoz. Az adatbázis pontosságának ellenőrzését humán immunglobulin G és szarvasmarha ribonukleáz B mintáról leemésztett szénhidrátokkal végeztem. Az eredmények jól tükrözték a glikoproteinekről származó *N*-glikánok és a standard *N*-glikánok közötti értékekben található elhanyagolható különbséget (IgG: <0.14 GU, RNáz B: <0.13 GU). Habár a glikánok szerkezetileg különböznek egymástól, de néhány esetben exoglikozidázos emésztés szükséges a cukrok együttes vándorlásának elkerüléséről. A jövőben ez az új alkalmazás lehetőséget nyújthat számos klinikai minta gyors vizsgálatára is.

Hőmérséklet és háttérelektrolit-összetétel változtatásának hatása a szénhidrátok elválasztására

A biopolimerek fizikai-kémiai tulajdonságainak jellemzésére sokáig a térháló vagy lineáris polimer géllal töltött kapilláris elektroforetikus eljárásokat alkalmazták, azonban napjainkban kizárólag a lineáris polimer géleket használják ugyanezen célokra. Másrészt, az aktiválási energia meghatározásának alkalmazásával lehetőség nyílik a hőmérséklet által kiváltott deformációs változások hatásait vizsgálni lineáris polimer gélekben. Az értekezés utolsó részében célul tűztem ki lineáris láncú, glükóz egységekből felépülő maltooligoszacharid valamint elágazó láncú, IgG-ről lehasított komplex *N*-glikán szerkezetek elektroforetikus mobilitás változásait vizsgálni kapilláris elektroforézissel. Különböző hőmérsékleten (20 – 50 °C) és eltérő összetételű gélekkel (pl. 0 – 60 % etilén-glikol; 0 – 3 % lineáris poliakrilamid és 0,4 % 300 kDa polietilén-oxid) tanulmányoztam az APTS-el jelölt *N*-glikánok vándorlását. Az eredmények jól tükrözték a hőmérséklet emelkedésével a glükóz egység (GU) értékek eltolódását lineáris és elágazó láncú szénhidrát szerkezeteknél egyaránt, amely a különböző mintakomponensek hőmérséklet-függő aktiválási energia értékek eltéréseiből adódtak. Így különösen fontos hangsúlyozni a hőmérséklet kontrol használatát, ha a már meglévő adatbázisból szeretnék meghatározni a GU értékeket minden egyes glikán szerkezetekhez.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A kapilláris gélelektroforézis napjaink egyik legdinamikusabban fejlődő analitikai módszerének tekinthető, melyet legfőképpen nukleinsavak, fehérjék és szénhidrátok elválasztására használnak. Együttműködő partnereink segítségével egy új, egycsatornás, LED- alapú fluoreszcens detektorral felszerelt, kapilláris gélelektroforézis rendszer került bevezetésre a bioanalitika területére. A kapilláris elektroforetikus elválasztást rövid mérési idő, nagy elválasztási hatékonyság, modern detektálási technika és teljes automatizálhatóság jellemzi, szemben a hagyományos lap gélelektroforézissel. Ezen okokból dolgozatom első részében a rendszer megbízhatóságának ellenőrzésére nagy molekulású genomiális DNS minta (~1000 darab) tisztaságát és degradációs fokát vizsgáltam. Relatív szórása (RSD) <0,75 % volt, amely kiváló reprodukálhatósági paramétereket mutatott.

A dolgozatom második részében haplotipizáló módszerek validálását végeztem el a CGE műszeren a WFS1 gén 3' szabályzó régiójában található *rs1046322* és *rs9457* mikro-RNS kötő SNP-k használatával. A migrációs idő reprodukálhatóság, a kimutatási határ és a detektor linearitás értékeit is meghatároztam összehasonlítva a hagyományos lap gélelektroforézis technikával. A CGE-LEDIF igen hatékony, gyors elemzést tett lehetővé, gyakran 4 percnél is rövidebb elválasztásokkal, valamint pontos mPCR minta bázispár értékeinek számolásával (2.4 – 9.2 %). A készülék érzékenysége 0,08 ng/μl (hígító pufferben) és 0,002 ng/μl (desztillált vízben) volt. Fontos megjegyezni, hogy injektáláskor a vízben hígított mPCR minták sokkal nagyobb mintabevitelt eredményeztek, mivel a puffer-ionok nem versenyeznek a mintamolekulákkal, így nagyobb érzékenységet lehetett elérni. Ezzel szemben a pufferrel történt mintahígítással pontosabb CGE méréseket kaptam. Továbbá a detektor linearitási értékek meghatározásakor egyértelmű lineáris detektor választ kaptam 0,08 – 10,0 ng/μl közötti koncentráció tartományban, melynek értéke $R^2 = 0.9997$ volt.

Dolgozatom harmadik részében a gliko-biomarker kutatás céljából neoglikoproteinek (szénhidrát antigén) szintézisét és azok vizsgálatát végeztem elektroforetikus és tömegspektrometriás módszerekkel. Annak érdekében, hogy megőrizzem a maltóz szerkezetet, a szénhidrátot formilheptil [7-(1,3-dioxán-2-il)-heptán-1-ol] hidmolekulán keresztül kapcsoltam a hordozó fehérjéhez (BSA) redukív aminálással. Az így előállított mesterséges szénhidrát antigének ellen egerekben termelt új cukorhoz specifikusan kötődő antitestek kimutatása ELISA teszttel történt. Az eredmények azt mutatták, hogy immunizálást követően a magasabb szénhidrát tartalmú

antigénekre (66 szénhidrát egység/mol) jóval nagyobb immunválasz jött létre, mint az alacsonyabb cukorszámú (32 szénhidrát egység/mol) glikokonjugátum ellen. Ha az antigén mennyiségét lecsökkentettem felező hígításban (1,25 – 0,08 µg/ml), akkor nagyobb immunválasz jött létre a szénhidrát antigénre, mint a hordozó fehérjére. Másrészt, nem történt IgG antitesttermelés maltóz és egyéb cukrok, mint például glükóz, izomaltóz, laktóz, galaktóz és maltodextrin hozzáadásával. Így megállapítható, hogy makromolekuláris hordozóhoz kötött szénhidrát molekulák olyan specifikus epitópotokat tartalmaznak, amelyek egyediek és alkalmasak specifikus ellenanyag termelésének kiváltására.

A dolgozat negyedik részében fehérjékhez kapcsolódó ANTS fluoreszcens festékkel jelölt *N*-glikán szerkezeti és GU adatbázist vezettem be egy új, egycsatornás, LED- alapú kapilláris gélelektroforézis készülék használatához. Az adatbázis jelenleg 25 oligoszacharidot tartalmaz, ezek többnyire a gyógyszeripar területén használt, mint például terápiás antitestek *N*-glikozilációs szerkezeti vizsgálataihoz szükségesek. Az adatbázis validálását humán immunoglobulin G és szarvasmarha ribonukleáz B glikoproteinekről lehasított *N*-glikánokkal végeztem el. Az eredmények megmutatták az elhanyagolható különbséget a glikoproteinekből származó *N*-glikánok és a standard *N*-glikánok GU értékei között (hlgG: <0.14 GU, RNáz B: <0.13 GU). Így a rendelkezésre álló adatbázis megkönnyítheti a kutatók további munkáit, mivel nem szükséges nagyszámú standardot minden elemzés során megfuttatni a kiértékeléshez. Ugyanakkor a CGE-LEDIF igen hatékony, gyors analízist tett lehetővé, gyakran 240 másodpercnél is rövidebb elválasztásokkal.

A dolgozatom utolsó részében lineáris, glükóz egységekből felépülő maltooligoszacharid (DP1-15), valamint elágazó lánccú – IgG glikoproteinről lehasított – komplex *N*-glikán szerkezetek elektroforetikus mobilitás változásait, nevezetesen a hőmérséklet-függő GU értékek eltolódását, vizsgáltam kapilláris elektroforézissel. Különböző hőmérsékleten (20 – 50 °C) és eltérő összetételű puffer rendszerekkel (0 – 60 % etilén-glikol, 0 – 3 % lineáris poliakrilamid és 0,4 % 300 kDa polietilén-oxid) tanulmányoztam az APTS fluoreszcens festékkel jelölt *N*-glikánok elektroforetikus vándorlását. Az eredmények azt mutatták, hogy a GU érték eltolódása feltehetően a különböző mintakomponensek hőmérséklet-függő aktiválási energia eltéréseiből erednek, ezért hangsúlyozni kell a hőmérséklet kontrol használatát minden egyes glikán szerkezetének vizsgálatakor.

7. ÚJ EREMÉNYEK, MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS AZOK JELENTŐSÉGE

- Munkám során egy új, egycsatornás, fluoreszcens detektorral felszerelt, kapilláris gélelektroforézis rendszert fejlesztettem tovább, valamint egy fehérjéhez kapcsolódó *N*-glikán adatbázist vezettem be a bioanalitika területére. Az adatbázis jelenleg 25 oligoszacharid szerkezetet tartalmaz.
- A glikán adatbázis fejlesztése során kapott mobilitás eredményeket felhasználva munkám során vizsgáltam a lineáris láncú maltooligoszacharid és az elágazó láncú összetett *N*-glikán szerkezetek egymáshoz képesti elektroforetikus mobilitás változásait különböző pufferrendszerekben a hőmérséklet függvényében. Megállapítottam és bebizonyítottam, hogy nem a viszkozitástól, hanem az adalékanyagtól függ a lineáris glükóz egységek elektroforetikus mobilitása, mivel aktiválási energia (E_a) igényük eltér a különböző pufferrendszerekben.
- Továbbá bebizonyítottam, hogy a poliakrilamid alapú géleknél a lineáris szénhidrát láncban a maltoheptóznál egy töréspont keletkezik, melyet egy konformáció-változás okoz (vagyis lineáris szerkezetű láncból helikálisan tekeredő szál alakul ki). Azt találtam, hogy ez a konformáció-változás az oka a különböző háttélektrolit oldatokban talált eltérő E_a igénynek. Azaz, a maltoheptóz (DP 2-7) polimerizációs fokig az elválásztás E_a igénye glükóz egységenként 212 J/mol értékkel növekszik, míg az e feletti (DP 7–15) növekedés lényegesen kisebb (68 J/mol). A 144 J/mol különbség oka, hogy a maltooligoszacharidok DP 7 alatt kevésbé hidrofíll tulajdonsággal rendelkeznek, így jobban kapcsolatba tudnak kerülni a lineáris poliakrilamid láncsal, amely magasabb E_a igényt eredményez.
- Továbbá megállapítottam, hogy az összetett *N*-glikán szerkezetek elektroforetikus mobilitása a hőmérséklet függvényében változik a különböző háttélektrolit oldatokban. Vagyis a viszkozitást növelő etilén-glikol tartalmú gélekben az *N*-glikánok GU értékei a hőmérséklet emelésével csökkennek, míg lineáris poliakrilamid és polietilén-oxidot tartalmazó gélekben az GU értékek a hőmérséklet emelésével növekednek. A növekedés oka a minta és a gélben levő polimerláncok között kialakult kölcsönhatás illetve a viszkozitásból eredő deformációs hatások. Kísérleteim alapján megállapítottam, hogy a GU értékek eltolódása a lineáris és elágazó láncú szénhidrátok esetében a hőmérséklet-függő E_a eltérésekből erednek, ezért különösen fontos a hőmérséklet kontrol használata a glikán szerkezetek analizisekor.

8. PUBLIKÁCIÓK



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR

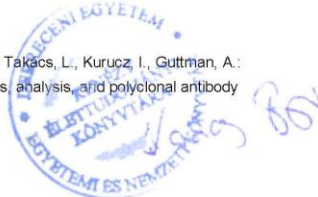


Nyilvántartási szám: DEENK/222/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kerékgyártó Márta
Neptun kód: F10PDA
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10037473

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kerékgyártó, M.**, Járvas, G., Novák, L., Guttman, A.: Activation energy associated with the electromigration of oligosaccharides through viscosity modifier and polymeric additive containing background electrolytes.
Electrophoresis. 37 (4), 573-578, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201500394>
IF: 2.482 (2015)
2. **Kerékgyártó, M.**, Guttman, A.: Capillary Gel Electrophoresis.
In: Analytical Separation Science. Ed.: Jared L. Anderson, Alain Berthod, Verónica Pino Estévez, Apryll M. Stalcup, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 555-580, 2015.
3. Guttman, A., **Kerékgyártó, M.**, Járvas, G.: Effect of Separation Temperature on Structure Specific Glycan Migration in Capillary Electrophoresis.
Anal. Chem. 87 (23), 11630-11634, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03727>
IF: 5.886
4. **Kerékgyártó, M.**, Guttman, A.: Towards the generation of an aminonaphthalene trisulfonate labeled N-glycan database for capillary gel electrophoresis analysis of carbohydrates.
Electrophoresis. 35 (15), 2222-2228, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201400054>
IF: 3.028
5. **Kerékgyártó, M.**, Fekete, A., Szirmai, Z., Kerékgyártó, J., Takács, L., Kurucz, I., Guttman, A.: Neoglycoproteins as carbohydrate antigens: synthesis, analysis, and polyclonal antibody response.
Electrophoresis. 34 (16), 2379-2386, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201300052>
IF: 3.161



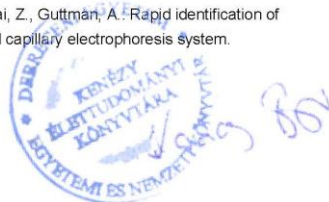
Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. • Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. • Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu • Honlap: www.lib.unideb.hu



6. **Kerégyártó, M.**, Németh, N., Kerekes, T., Rónai, Z., Guttman, A.: Ultrafast haplotyping of putative microRNA-binding sites in the WFS1 gene by multiplex polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis.
J. Chromatogr. A. 1286, 229-234, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.062>
IF: 4.258
7. **Kerégyártó, M.**, Kerekes, T., Tsai, E., Amirkhaniyan, V. D., Guttman, A.: Light-emitting diode induced fluorescence (LED-IF) detection design for a pen-shaped cartridge based single capillary electrophoresis system.
Electrophoresis. 33 (17), 2752-2758, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201200139>
IF: 3.261

További közlemények

8. Járvás, G., **Kerégyártó, M.**, Guttman, A.: On the electromigration of charged-fluorophore labeled oligosaccharides in polyethylene oxide solutions.
Electrophoresis. [Epub ahead of print], 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201600183>
IF: 2.482 (2015)
9. Székely, A., Szekrényes, Á., **Kerégyártó, M.**, Balogh, A., Kádas, J., Lázár, J., Guttman, A., Kurucz, I., Takács, L.: Multi Capillary SDS-Gel Electrophoresis for the Analysis of Fluorescently Labeled mAb preparations: a high throughput quality control process for the production of QuantiPlasma and PlasmaScan mAb libraries.
Electrophoresis. 35 (15), 2155-2162, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201400208>
IF: 3.028
10. Németh, N., **Kerégyártó, M.**, Sasvári-Székely, M., Rónai, Z., Guttman, A.: Rapid identification of human SNAP-25 transcript variants by a miniaturized capillary electrophoresis system.
Electrophoresis. 35 (2-3), 379-384, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201300221>
IF: 3.028





11. Szekrényes, Á., Roth, U., **Kerégyártó, M.**, Székely, A., Kurucz, I., Kowalewski, K., Guttman, A.:
High-throughput analysis of therapeutic and diagnostic monoclonal antibodies by
multicapillary SDS gel electrophoresis in conjunction with covalent fluorescent labeling.
Anal. Bioanal. Chem. 404 (5), 1485-1494, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-012-6213-2>
IF: 3.659

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 34,273

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
22,076**

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, 2016.08.24.

