



Pannon Egyetem
Tudományos Diákköri Konferencia
2025



**Agyszövet *N*-glikozilációjának vizsgálata kapilláris
elektroforézissel**

Készítette: Kiss Beatrix

Szak: Biomérnök alapszak, 3. évfolyam

Témavezetők: Dr. Járvás Gábor, Török Rebeka

Mérnöki Kar, Bio-Nanotechnológiai Műszaki Kémiai Kutató Intézet,
Transzlációs Glikomika Kutatócsoport

A pályamunka lezárásának dátuma: 2024. december 19.

Kivonat

Napjainkban egyre nagyobb szerepet kapnak a különböző megbetegedések korai felismerésére és kezelésére alkalmas vizsgálati módszerek. Ehhez olyan biokémiai jelzőanyagokra van szükség, amelyekkel pontosan meghatározhatók az eltérő betegségek és azok különböző klinikai stádiumai. Az 1960-as évek óta a glikánok, mint biomarkerek fontos szerepet játszanak a diagnosztikai kutatásokban, mint például a daganatos megbetegedések (prosztatarák), a gyulladásos folyamatok (diabétesz), és a neurológiai betegségek esetében. Ez utóbbi, azaz a neuropszichiátria problémák jelentős betegellátási költséget (hosszú távú kezelési és rehabilitációs terhet) jelentenek az egészségügyi rendszerre világszerte. A World Health Organization (WHO) adatai alapján közelítőleg 55 millió ember szenved demenciában. A betegség progresszív jellegű, tehát az öregedő népességgel arányosan várhatóan egyre gyakoribb lesz a jövőben. A demencia egyik leggyakoribb formája az Alzheimer-kór, mely körülbelül 60-70%-a az összes demenciás esetnek. Munkám során különböző neuropszichiátriai rendellenességben elhunyt páciensek autopsziás agymintáiból, - mint például demencia, schizophrenia és depresszió - származó szövetek glikán profilját analízálom lézer indukált fluoreszcens detektálással kapcsolt kapilláris elektroforézis (CE-LIF) módszerrel. Ezáltal releváns képet kaphatok az agyszövet különböző területeire specifikus cukorszerkezetekről, amely segítségével nagy felbontással, úgynevezett glikán mapping megközelítésben feltérképezhetjük az agyszövet szénhidrát profilját. Kutatásom első lépésében sertés agyszövet *N*-glikán profilját vizsgáltam, amely során optimalizáltam a mintaelőkészítési paramétereket, különös tekintettel a zsírtalanítási lépések megvalósítására, a mintaelőkészítési protokoll reprodukálhatóságára és robusztusságára a minták esetén. Munkám további célja, hogy a humán agyszöveteket az általam optimalizált módszerrel feldolgozzam és a kapott információk alapján specifikus glikomikai térképet hozzak létre a különböző neurológiai betegségekhez kapcsolódva, hangsúlyt helyezve az Alzheimer-kórra. További célunk, hogy egy olyan klinikailag releváns adatbázist hozzunk létre, mellyel glikomikai szempontból nyernénk betekintést a humán agy molekuláris folyamataiba. Ezzel lehetőséget teremtenénk új biomarkerek azonosítására, amelyek a jövőben hozzájárulhatnak a neurológiai betegségek, például az Alzheimer-kór korai diagnosztizálásához és potenciálisan új terápiás megközelítések fejlesztéséhez.

Kulcsszavak: *N*-glikán; Alzheimer-kór; biomarker; kapilláris elektroforézis; humán agyszövet

Tartalomjegyzék

1	Elméleti háttér.....	1
1.1	Neurológiai betegségek.....	1
1.2	Biomarkerek.....	3
1.2.1	Glikomika.....	4
1.2.2	<i>N</i> -glikoziláció.....	6
1.2.3	A glikán analízis.....	8
1.3	BeatBox.....	9
1.4	Kapilláris elektroforézis.....	10
1.4.1	CE rendszer felépítése.....	11
1.4.2	Kapilláris elektroforézishez alkalmazható detektorok.....	11
2	Anyagok, eszközök és módszerek.....	13
2.1	Reagensek.....	13
2.2	Biobank.....	13
2.3	Mintaelőkészítés.....	13
2.4	A minta analitikai vizsgálata.....	14
3	Eredmények.....	15
3.1	A mintaelőkészítési protokoll optimalizálása.....	15
3.1.1	Precipitálás.....	15
3.1.2	Formalin fixálás.....	17
3.1.3	Zsírtalanítási mosás.....	19
4	Összefoglalás.....	26
	Köszönetnyilvánítás.....	27
5	Irodalomjegyzék.....	28

Rövidítések jegyzéke

ACN	Acetonitril (Acetonitrile)
Asn	Aszparagin (Asparagin)
BST	Bracketing módszer (Bracketing Standard Technique)
CE-LIF	Lézer indukált floureszcens detektálással kapcsolt kapilláris elektroforézis (Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection)
COPD	Krónikus obstruktív tüdőbetegség (Chronic Obstructive Pulmonary Disease)
DNS	Dezoxiribonukleinsav (Deoxyribonucleic acid)
DP	Polimerizáció foka (Degree of Polymerisation)
DTT	Ditiotreitol (Dithiothreitol)
EOF	Elektroozmotikus áramlás (Electroosmotic flow)
ER	Endoplazmatikus retikulum (Endoplasmic Reticulum)
EtOH	Etanol (Ethanol)
HCL	Hidrogén-klorid (Hydrogen chloride)
HPLC	Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (High-Performance Liquid Chromatography)
LC	Folyadékkromatográfia (Liquid chromatography)
MRI	Mágneses rezonancia képalkotás (Magnetic Resonance Imaging)
MS	Tömegspektrometria (Mass spectrometry)
NaOH	Nátrium-hidroxid (Sodium hydroxide)
NP-40	Nonidet P-40
PAGE	Poliakrilamid gélelektroforézis (polyacrylamide gel electrophoresis)
PCR	Polimeráz láncreakció (polimerase chain reaction)
PET	Pozitronemissziós tomográfia (Positron Emission Tomography)
PNGase F	Peptid N-glikozidáz F (Peptide N-glycosidase F)
RFU	Relatív floureszcens egység (Relative Fluorescence Unit)
RNS	Ribonukleinsav (Ribonucleic acid)
RSD	Relatív szórás (Relatív standard deviation)

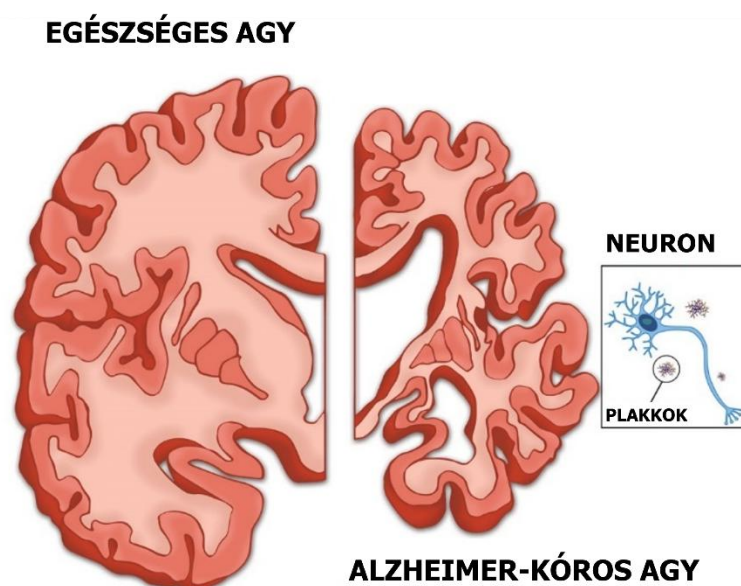
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát (Sodium dodecyl sulfate)
Ser	Szerin (Serine)
THF	Tetrahidrofurán (Tetrahydrofuran)
Thr	Threonin (Threonine)
TRIS	Tris(hidroximetil)-aminometán (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)
UH	Ultrahang (Ultrasound)
UV	Ultraibolya (Ultraviolet)
UV/VIS	Ultraibolya és látható fény spektrofotometria (Ultraviolet/Visible Spectrophotometry)
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

1 Elméleti háttér

1.1 Neurológiai betegségek

A neurológiai betegségek világszerte jelentős egészségügyi problémát jelentenek, és előfordulási gyakoriságuk a statisztikák alapján folyamatosan növekszik [1]. Ennek oka, hogy általában idős korban jelentkezik, és progresszív jellegűek, tehát az elöregedő társadalommal összefüggésben ezek a betegségek is egyre gyakoribbak lesznek a jövőben. A neurológiai betegségek az agyat, a gerincvelőt és az idegeket érintő rendellenességek, melyek az idegrendszer különböző részeinek normál működését zavarják, ami hatással lehet a mozgásra, érzékelésre, viselkedésre, a gondolkodásra és a mentális állapotra is [2]. Kialakulását több tényező is befolyásolhatja, mint a genetikai hajlam, az életmódbeli tényezők (pl. dohányzás, alkoholfogyasztás, rossz táplálkozás), a környezeti hatások (pl. fertőzések, mérgező anyagok), és más szisztémás betegségek is [3-5]. Ezen felül a kor és a nem szintén fontos kockázati tényezők, különösen a degeneratív betegségek esetében [6, 7]. Napjainkban a leggyakoribb neurológiai betegségek közé tartozik az Alzheimer-kór, a Parkinson-kór, a stroke, valamint a Sclerosis multiplex [1]. Jelenleg körülbelül 55 millió ember szenved demenciában, melynek az egyik leggyakoribb formája az Alzheimer-kór. Ez megközelítőleg az összes eset 60-70%-át teszi ki [6, 8]. A legfrissebb adatok szerint 2050-re a demencia előfordulásának aránya megduplázódik Európában és megháromszorozódik világszerte [9]. A kór jellegzetes agyi elváltozásai az amiloid plakkok és a tau fehérje csomók kialakulása különösen a hippocampusban, amely a memóriáért és a tanulásért felelős [8]. Az amiloid plakkok az agysejtek között felhalmozódó amiloid- β fehérje lerakódások. Ezek toxikusak, és gátolják a neuronok közötti kommunikációt, ami idegsejt-pusztuláshoz vezet. Ennek hatására az agy bizonyos területei fokozatosan összehúzódnak, ami az érintett agyterületek méretének csökkenéséhez vezet, ez látható az 1. ábrán. A tau fehérje csomók a neuronokon belül keletkeznek, amikor a tau fehérjék hibásan foszforilálódnak és csomókat képeznek, destabilizálva a sejtvázatot. Ez megzavarja a tápanyagok és anyagok szállítását, végső soron sejthalálhoz vezetve. Mindkét folyamat kulcsfontosságú a betegség progressziójában. Az Alzheimer-kór tünetei fokozatosan romlanak, kezdve a rövid távú memóriazavarral, a zavarodottsággal és a nyelvi nehézségekkel, majd súlyosbodva a tájékozódási problémákig és a szociális interakciók elvesztéséig [10, 11]. A betegség gyakoribb nőknél, valószínűsíthetőleg a hormonális különbségek és a hosszabb élettartam miatt [12]. Általában idősebb korban diagnosztizálják, de fiatal felnőtteknél, sőt ritkán gyermekeknél is előfordulhat Alzheimer-kór

[13-15]. Jelenleg nincs olyan gyógymód, amely teljes mértékben gyógyítaná az Alzheimer-kórt, de vannak olyan kezelési lehetőségek, amelyek a tüneteket enyhíthetik, illetve lassíthatják a betegség előrehaladását. Ilyenek lehetnek például a gyógyszeres- és a kognitív terápiák, amelyek a memória javításában segítenek, vagy az életmódbeli változtatások [16, 17]. A neurológiai betegségek jelentős mértékben befolyásolják az érintettek életminőségét, és sok esetben hosszú távú ápolást, speciális ellátást és támogatást igényelnek [18]. Az időben történő felismerés és megfelelő kezelés kulcsfontosságú a progresszió lassítása és a tünetek enyhítése érdekében. Ezért különösen fontos, hogy mélyrehatóan megértsük az agyszövet azon részeit, amelyek a betegség kialakulásáért felelősek. A korai diagnózis és a kezelési lehetőségek kulcsfontosságúak a betegség kezelésében [10, 19, 20]. Az Alzheimer-kór agyszöveti kutatásai már évtizedek óta jelentős területet képeznek a neurodegeneratív betegségek megértésében.



1. ábra Alzheimer-kóros és egészséges agy összehasonlítása [21]

A betegségnek különböző stádiumai vannak, és az agyban már a korai szakaszban is megfigyelhetők olyan rendellenességek, amelyek a betegség későbbi kialakulását jelezhetik [22]. Ezek a biomarkerek mint például az amiloid plakkok és a tau fehérjék, kapcsolatba hozhatók más neurodegeneratív betegségekkel is, és segítséget nyújthatnak a betegség korai felismerésében. A kór diagnózisa az 1900-as évek elején kizárólag kórbonctani vizsgálattal volt lehetséges, azonban 1984-re elérhetővé vált a klinikai megközelítés is [23]. Így az alkalmazott postmortem szövetvizsgálatokat felváltották a képalkotó eljárások (pl. PET, MRI), amelyek lehetővé tették, hogy az Alzheimer-kór diagnosztikájában használt biomarkerek, élő pácienseknél is kimutathatók legyenek, elősegítve a korai felismerést és a betegség folyamatának nyomon követését [8, 23, 24]. Figyelembe véve a biomarker-kutatás fejlődését

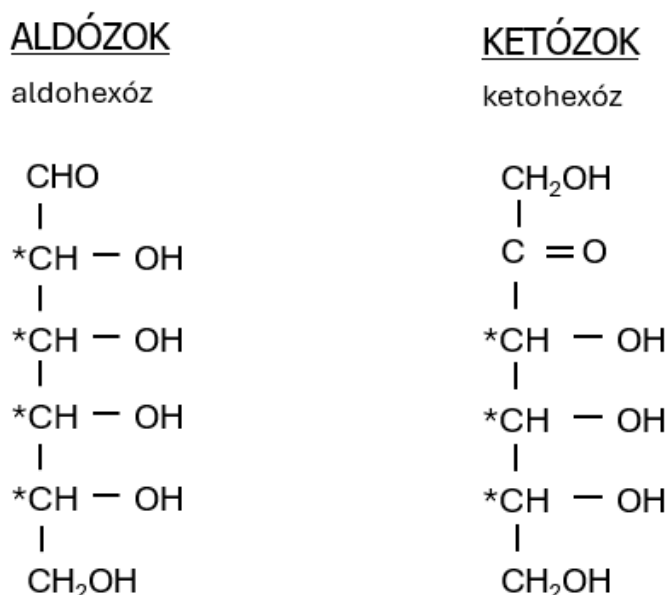
és az orvosi diagnosztikában való felhasználás iránti igényt, a kórspecifikus biomarkereket: A (amiloid plakkok mennyisége), T (foszforilált tau szintje) és N (neurodegenerációs folyamatok) kategóriákba sorolták: ez az ATN keretrendszer. A rendszer célja, hogy egységesítse az Alzheimer-kór diagnózisához használt biomarkereket, és lehetővé tegye a betegség különböző fázisainak pontosabb meghatározását, még a tünetek megjelenése előtt [25]. Azonban az eddigi kutatások során, ahol az agyi fehérjékről leválasztott *N*-glikánokat analizáltak, különösen a hippokampuszban és a frontális kéregben (a kórban kiemelten érintett agyterületek) bizonyították, hogy az Alzheimer-kór során az *N*-glikán profil is jelentősen megváltozik, és a különböző glikánok eltérő mennyiségben vannak jelen a betegséggel érintett agyterületeken, így az amiloid plakkokon kívül a glikánok is ígéretes biomarkereknek bizonyulnak, mivel a fehérjék glikozilációs mintázatának megváltozása jelentős szerepet játszhat a betegség patológiájában [26].

1.2 Biomarkerek

A biomarkerek olyan biológiai jelzőanyagok, amelyeket a betegségek diagnózisára, a kezelési hatékonyság nyomon követésére és a betegség prognózisának előrejelzésére használnak. Ezek a molekulák lehetnek fehérjék, hormonok, genomiális markerek (pl. DNS vagy RNS), szénhidrátmetabolitok, *N*-glikánok vagy akár sejtek is [27]. A biomarkerek a test különböző részeiből, például vérből, vizeletből vagy szövetmintákból nyerhetők, és kulcsszerepet játszanak az orvostudományban, lehetővé téve a precíz diagnózist és a személyre szabott kezeléseket. Az orvosi diagnosztika fejlődésével a biomarkerek egyre nagyobb szerepet kapnak, mivel lehetőséget nyújtanak a betegségek korai felismerésére és a kezelés hatékonyságának monitorozására. Az ideális biomarkernek specifikusnak, érzékenynek és reprodukálhatónak kell lennie, lehetővé téve a pontos diagnózist és a megfelelő kezelési terv kidolgozását [28]. Ezek az anyagok különböző betegségek esetében más-más jelentőséggel bírnak. A rákos megbetegedések esetén olyan biomarkereket keresnek, amelyek a daganatok jelenlétére vagy a betegség előrehaladására utalnak [29]. Ezentúl a biomarkerek segíthetnek a gyógyszeres terápia személyre szabásában is, hiszen a betegek genetikai profilja és biológiai jellemzői alapján optimalizálhatók a kezelések. Emiatt a biomarkerek kutatása és fejlesztése folyamatosan zajlik, új lehetőségeket teremtve az orvostudomány számára. A jövőbeli orvosdiagnosztikai kutatások célja a biomarkerek azonosítása és validálása különböző betegségekkel összefüggésben, hogy támogathassák a személyre szabott orvoslást és a betegek életminőségének javítását [28].

1.2.1 Glikomika

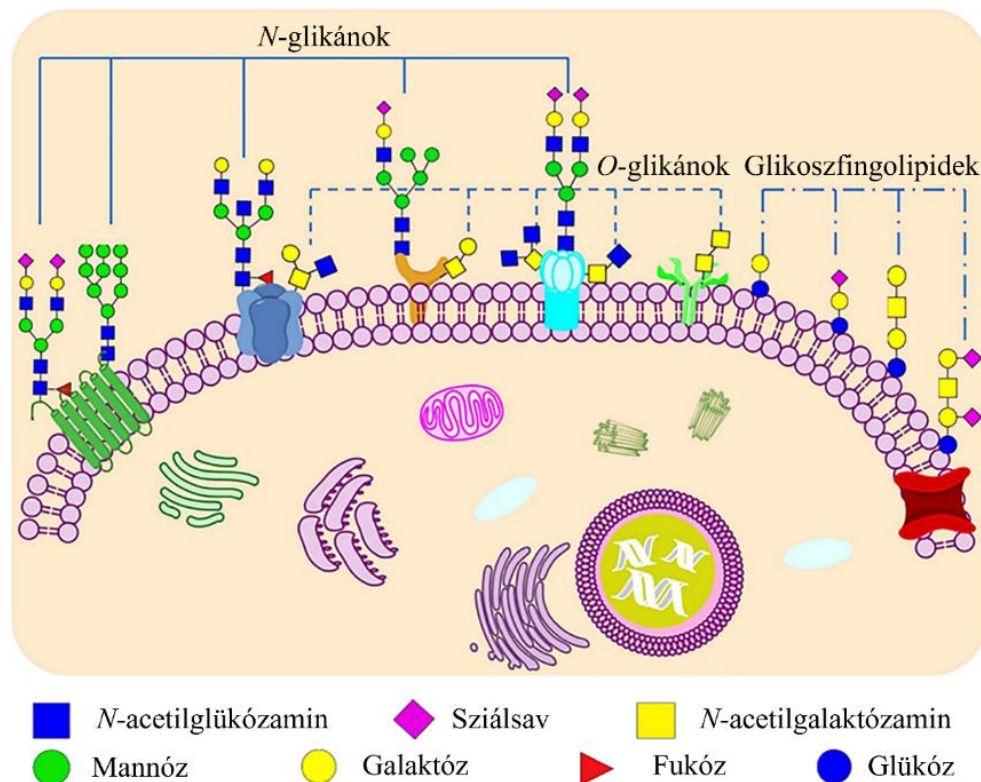
A glikánok a természetben legnagyobb számban előforduló és legváltozatosabb biopolimerek, amelyek általában a sejtek szekréciós útvonalán (riboszómák, Golgi-készülék és endoplazmatikus retikulum) hozzáadott monoszacharidokból épülnek fel [27]. Ahogy a természetben a fehérjék esetében is megfigyelhető, a glikánok szerkezeti sokfélesége is fokozható, ha hidroxilcsoportjaikat foszfátokkal, szulfátokkal vagy acil-észterekkel, valamint aminocsoportjaikat acetil- vagy szulfátcsoportokkal módosítja a szervezet [30]. Azonban a monomerek szerkezetében és a szacharidok közötti kötések típusában, valamint a glikánok kapcsolódási helyeiben tapasztalható hatalmas variáció miatt a glikom bonyolultsága nagyságrendekkel meghaladja a fehérjékét. A szénhidrátok mono-, oligo- és poliszacharid formában minden élőlényben jelen vannak, és különböző biológiai funkciókat látnak el [31]. A monoszacharidok glikozidos hidroxilcsoportja vízkilépéssel egy másik monoszacharid hidroxilcsoportjával tud kapcsolódni, így 2-10 monomerből álló oligoszacharidok képződnek. Amennyiben a kapcsolódó monomerek száma meghaladja a tízet, poliszacharidokat kapunk. A szénhidrátok funkciós csoportjai a karbonil- és hidroxilcsoport. A karbonilcsoport elhelyezkedése alapján megkülönböztetünk aldózokat, ahol a csoport a lánc végén található (glükóz vagy a mannóz), és ketózokat (2. ábra), ahol ez a lánc közepén fellelhető (fruktóz vagy ribulóz).



2. ábra Aldóz és ketóz szerkezeti képlete, ahol a csillaggal jelölt szénatomok jelentik a kiralitáscentrumokat

Az elmúlt néhány évtizedben jelentősen megváltoztak a szénhidrátokkal kapcsolatos elképzeléseink: sokáig csak vázanyagként, energiaforrásként vagy a nukleinsavak alkotóiként

tekintettek rájuk. Mára, a glikomika tudományának fejlődésének köszönhetően, fény derült különböző, a glikánok és fehérjék, valamint sejtek közötti kölcsönhatásokra, amelyeknek jelentős élettani szerepük van. A különböző glikoformák lényeges szerepet játszanak a biológiai folyamatokban és rendszerekben, például a vírusfertőzés, a gyulladásos reakciók, a sejt-sejt és a baktérium-gazdasejt kölcsönhatások során, fehérjék orientációjának és stabilitásának kialakításában vagy biomarkerként [31]. A rákos megbetegedések következtében megváltozott glikánstruktúrákat már az 1960-as években felfedezték [32]. Azóta a glikánok, mint biomarkerek, fontos szerepet játszanak a diagnosztikai kutatásokban, különösen olyan betegségek esetében, mint a daganatos megbetegedések (tüdőrák, prosztatarák), a gyulladásos folyamatok (például a diabétesz) és a neurológiai rendellenességek [26, 29, 33, 34]. Bár a glikánok változásai gyakran nem követnek szigorú mintázatot, számos külső tényező, például a hőmérséklet és a pH, valamint biológiai tényezők, mint az életkor és a táplálkozás, jelentősen befolyásolhatják őket [35, 36]. A glikánstruktúrák mennyiségének növekedése vagy csökkenése, egymáshoz viszonyított arányuk eltolódása, illetve akár új szerkezetek megjelenése is előfordulhat [37]. Az emberi sejtek felszínét egy sűrű glikánréteg borítja (3. ábra), amely a membrán fehérjékhez és lipidekhez kapcsolódik – ezt glikokalixnak nevezzük, amely akár 10-szer, egyes esetekben 1000-szer vastagabb, mint a sejtmembrán. A glikokalix az egyes sejtek „ujjlenyomata”, egyfajta azonosító, mellyel a sejt képes felismerni más sejteket, kommunikálni velük, és részt venni olyan folyamatokban, mint az immunválasz vagy a sejt-sejt adhézió, így segítve a szöveti integritás fenntartását és a különböző sejtek közötti kölcsönhatásokat [27, 31]. A transzplantált szöveteken, a behatoló organizmusokon és a beteg sejtek felszínén található idegen glikán mintázatokat szolubilis (a testfolyadékokban szabadon jelen lévő) és sejtfelszíni glikán receptorok ismerik fel, amelyek azonnal aktiválják az immunválaszt. Mivel a glikánok sok biológiai folyamatban részt vesznek, nem meglepő, hogy a glikánszintézis molekuláris hibáit egyre több betegség közvetlen okaként ismerik el, és hogy biomarkerként is funkcionálhatnak. A cukrok szerkezeti kapcsolódása alapján elkülöníthetünk glikoproteineket és proteoglikánokat. Az utóbbi esetében glükozaminoglikánok kapcsolódnak a központi core fehérjéhez, míg a glikoproteinekben a polipeptidláncokhoz különböző felépítésű oligoszacharidok kapcsolódnak. A glikoproteinekhez való kapcsolódás folyamata a glikoziláció, amely alapján aszparaginhoz kötött N-típusú, szerinhez vagy treoninhoz kötött O-típusú, valamint ritkán előforduló C-típusú glikánokat különböztethetünk meg [38].



3. ábra A sejtfelszínen megtalálható glikánstruktúrák [39]

A TDK munkám során *N*-típusú glikánokat vizsgáltam, amelyeket endoglikozidáz enzim segítségével tudunk leválasztani a fehérjéről.

1.2.2 *N*-glikoziláció

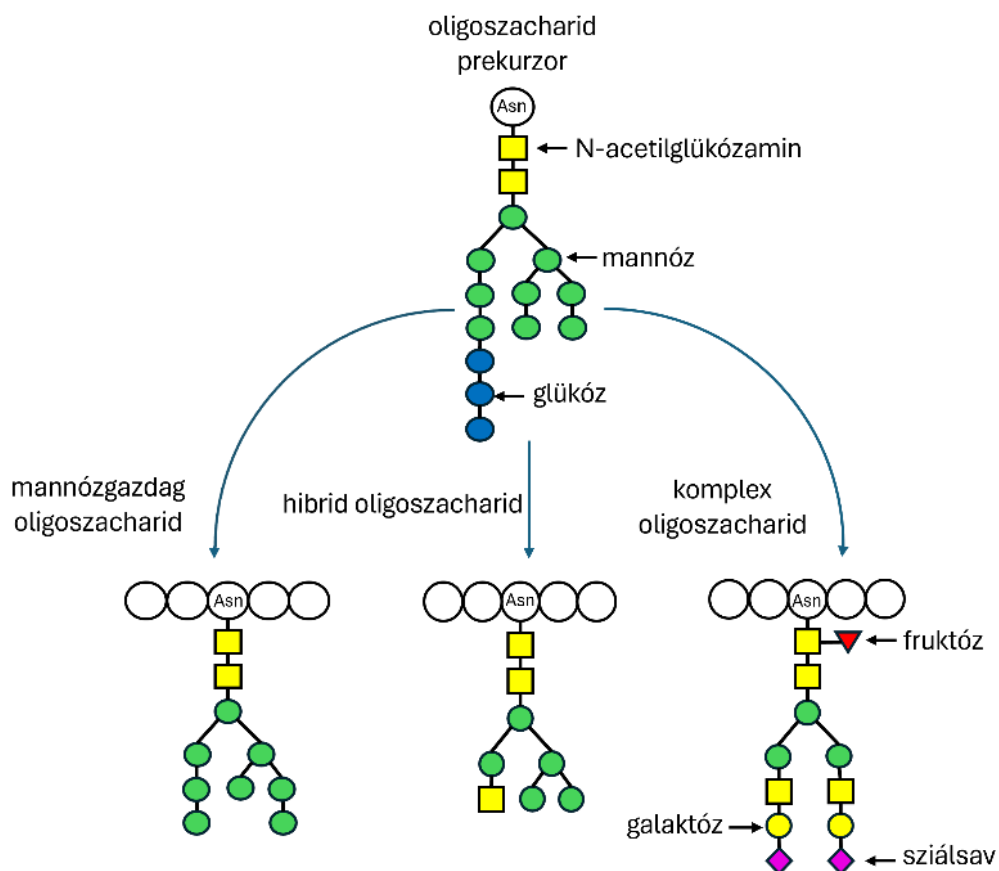
A fehérjék aszparaginhoz kötött *N*-glikozilációja egy co- és poszttranszlációs módosítás, amely a co-transzlációs folyamatnál kezdődik a riboszómán és az endoplazmatikus retikulumban (ER) folytatódik. A folyamat során a fehérjéhez *N*-glikán láncok kapcsolódnak az aszparagin (Asn) oldalláncához [40].

Az *N*-glikoziláció fő lépései a következők (4. ábra):

1. **Oligoszacharid előkészítése:** Az ER membránján egy előre meghatározott cukorlánc, amely általában 14 cukoregységből áll (9 mannóz, 3 glükóz és 2 *N*-acetyl-glükózamin), szintetizálódik egy dolichol-foszfát nevű membránlipidre.
2. **Átvitel a fehérjére:** A glikoziltranszferáz nevű enzimkomplex felismeri a fehérjében található specifikus aszparagin szekvenciát (Asn-X-Ser/Thr, ahol X bármilyen aminosav lehet), és az előkészített cukorláncot a fehérjéhez kapcsolja az aszparagin

oldalláncán keresztül. Az így létrejött molekula az endoplazmatikus retikulum (ER) lumenébe transzlokálódik, ahol poszttranszlációs módosulások zajlanak le rajta.

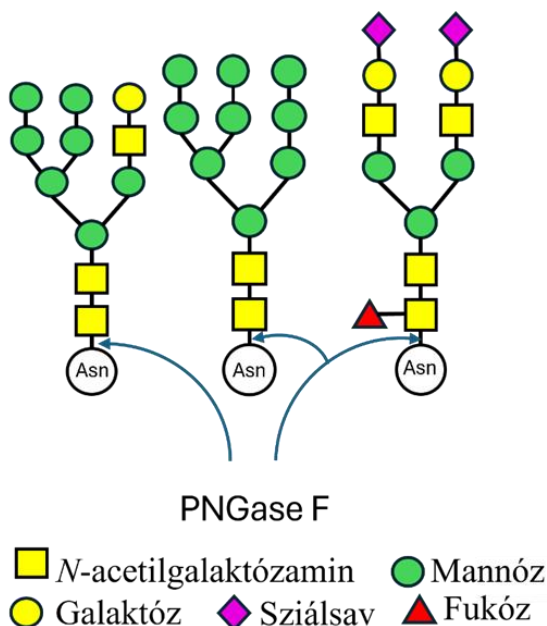
3. **Módosítások:** A cukorlánc kezdetben még nem teljesen érett, így a glükóz egységek lehasadnak, és további módosítások történnek, ahogy a fehérje az ER-ből a Golgi-készülékbe kerül. A Golgiban az oligoszacharid lánc szerkezete további finomításokon megy keresztül, például különböző cukormolekulák hozzáadása vagy eltávolítása történik, hogy létrejöjjenek a végleges, érett *N*-glikán struktúrák [41].



4. ábra Az *N*-glikolizáció lépései [38]

Az *N*-glikoziláció alapvető szerepet játszik a fehérjék szerkezetének stabilizálásában, megfelelő hajtogatásában, valamint a fehérjék biológiai funkcióinak szabályozásában. A glikoziláció révén három fajta *N*-kötött oligoszacharid alakulhat ki: a mannózgazdag, a hibrid és a komplex oligoszacharidok. A munkám során PNGase F endoglikozidáz enzimet használtam, hiszen az szelektíven hasítja az *N*-kötésű glikánokat az aszparagin oldalláncról, így termékként egy cukorláncot és egy polipeptidet kapunk [42, 43]. A folyamat során a glikánok

szabadon oldódnak a reakcióközegben, ami lehetővé teszi azok további vizsgálatát. A PNGase F működési mechanizmusának sémája az 5. ábrán látható.



5. ábra PNGase F endoglikozidáz enzim működési mechanizmusa

A szabadon lévő glikánok azonban sem színnel, sem töltéssel nem rendelkeznek, ezért 8-aminoprén-1,3,6-triszulfonát (APTS) fluoreszcens festékkel biztosítjuk számukra mind a töltést, mind a színt, amely lehetővé teszi a detektálásukat [44]. Az elválasztáshoz a kutatócsoport által fejlesztett CATRIS puffert alkalmaztam, melynek legnagyobb előnye, hogy tisztítás nélkül fluorofór festékkel túltelített oldatban is tudjuk a glikánokat detektálni [45]. Az elválasztás során BST-t alkalmaztam, amely lehetővé tette, hogy a különböző elválasztási paraméterek között végzett elválasztások esetén is pontos, összehasonlítható eredményeket kapjunk. Az általam is használt DP4 és DP15 belső standardek segítenek a glikán szerkezetek migrációs idejének pontos meghatározásában [46].

1.2.3 A glikán analízis

A glikánok mennyiségi és minőségi meghatározása kulcsfontosságú a glikomikai kutatásokban, mivel ezek a molekulák fontos szerepet játszanak számos biológiai folyamatban, beleértve a sejtfelismerést, az immunválaszt és a fehérjék biológiai funkcióit. Az analízisukhoz alkalmazott technikák lehetővé teszik a glikánok szerkezetének és összetételének pontos meghatározását, valamint azok mennyiségi jelenlétének mérését különböző biológiai mintákban. A legelterjedtebbek a tömegspektrometria, a nagynyomású

folyadékkromatográfiás és kapilláris elektroforetikus elválasztáson alapuló módszerek [47]. A HPLC és az MS mindkettő hatékony módszer az anyagok analizálására, de megvannak a saját erősségeik és hátrányaik [48]. A HPLC előnye, hogy hatékonyan alkalmazható komplex keverékek elválasztásában, széleskörűen használható különféle anyagok vizsgálatára, és megbízható kvantitatív elemzést biztosít. Ugyanakkor költséges, sok oldószert igényel, ami környezeti terhet jelent, és az előkészítési fázis időigényes lehet. Az MS kiemelkedő a molekulák szerkezetének azonosításában és kis mennyiségű anyagok érzékeny kimutatásában, de szintén költséges, és speciális képzést igényel a kezelése. Ezzel szemben a kapilláris elektroforézis (CE) előnye, hogy rendkívül gyors, költséghatékony és rugalmas módszer [49]. Kevés oldószert igényel, így környezetbarátabb megoldást kínál, kisebb mintaigény mellett is kiváló eredményeket biztosít, ami különösen fontos a biológiai minták elemzésében. Mivel a CE az elektromos tér alkalmazásával választja el a töltött molekulákat, gyors és érzékeny elválasztást tesz lehetővé [50]. Ezen előnyök miatt munkám során kapilláris elektroforézist használtam.

1.3 BeatBox

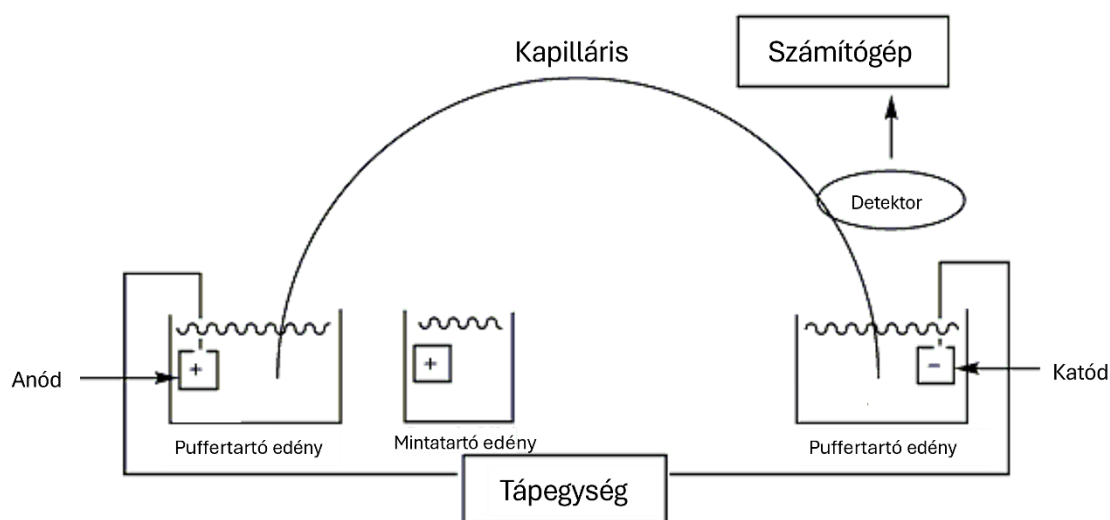
A BeatBox berendezés egy mágneses szövethomogenizátor melynek célja, hogy automatizálja és egyszerűsítse a proteomikai minták előkészítését, ami sokszor időigényes és komplex folyamat. Ahhoz, hogy a BeatBox-ot hatékonyan kihasználhassuk, kutatócsoportunk együttműködést kezdett a PreOmics céggel. A partnerség ötvözi erősségeinket a glikán analízis területén, különös tekintettel az emberi szövetmintákra. Ez az együttműködés lehetővé teszi számunkra, hogy gyorsan integráljuk a legújabb technológiai fejlesztéseket kutatásunkba. Az eszközben mágnesgyöngyök segítségével egyszerre akár 96 mintát tud homogenizálni. A mágneses gyöngyök szerepe ebben a folyamatban az, hogy a mágneses tér hatására mechanikai erőt fejtsenek ki a mintára, ezáltal fizikailag feldarabolják a szöveteket és sejtszerkezeteket, homogén elegyet létrehozva a későbbi analízishez. A módszer előnye, hogy az ilyen fajta homogenizálás reprodukálható és reprezentatív mintákat eredményez.

1.4 Kapilláris elektroforézis

Az elektroforézis története szorosan összefonódik a biokémia és a molekuláris biológia fejlődésével. A módszer alapjait a 19. század végén fektették le, amikor a tudósok felfedezték, hogy az elektromos áram képes az ionok és más töltött részecskék mozgását előidézni egy folyadékban. A módszert először 1937-ben alkalmazta egy svéd tudós, Arne Tiselius, aki különböző fehérjéket választott el egy kezdetleges elektroforetikus berendezéssel [51, 52]. Az évtizedek során bekövetkezett fejlődésnek köszönhetően a CE ma már az egyik leggyakrabban használt elválasztástechnikai módszer, amelyet különböző molekulák, például ionok, fehérjék, peptidok, aminosavak és gyógyszerek analízisére használnak [50, 53, 54]. A módszer alapja, hogy a töltéssel rendelkező részecskék elektromos tér hatására különböző sebességgel mozognak egy vékony kapilláris csőben. A részecskék elválasztása a méretük, töltésük és alakjuk alapján történik. A szilikát üveg kapilláris felületén negatív töltésű funkciócsoportok találhatók, amelyek vonzzák a pozitív töltésű ellenionokat. Ezek a pozitív ionok a negatív elektród felé mozognak, miközben magukkal húzzák az oldószermolekulákat. Ezt a jelenséget nevezzük elektroosmotikus áramlásnak. Az elválasztás során a töltéssel nem rendelkező molekulák az elektroosmotikus áramlással közel azonos sebességgel haladnak, így elválasztásuk csak kis mértékben történik meg. A pozitív töltésű ionok gyorsabban mozognak, míg a negatív töltésű ionok lassabban haladnak. A minta áramlása minimális hőtermelést eredményez azonban az elektroforézis kis átmérőjű kapillárisban történő végrehajtása lehetővé teszi nagyobb elektromos mező alkalmazását, mivel a kapilláris hatékonyan vezeti el a keletkező hőt [55]. Az elektromos mező növelésével gyorsabb és hatékonyabb elválasztást érhetünk el. A kapilláris elektroforézis további előnyei közé sorolhatjuk, hogy a nagy térerő alkalmazásának (gyakran nagyobb, mint 500 V/cm) a hatékonysága eléri vagy meghaladja a gázkromatográfiáét, az elválasztáshoz szükséges idő nagyon rövid, a mennyiségi analízis könnyen automatizálható, kis mennyiségű minta és reagens szükséges, más analitikai elválasztási technikákkal összehasonlítva széleskörű elemzést tesz lehetővé [49, 56]. A CE számos területen alkalmazható, beleértve a biokémiát, gyógyszerkutatást, klinikai diagnosztikát és élelmiszeranalitikát [53, 57-59]. Különösen hasznos a komplex minták analizálásában, ahol nagy pontosságú és érzékenységu eredmények szükségesek. Ezek azonosítása és mennyiségi meghatározása általában különböző detektáló módszerekkel történik, például fluoreszcens detektálással, tömegspektrometriával vagy UV/VIS spektrometriával.

1.4.1 CE rendszer felépítése

Az elválasztó rendszer központi eleme egy vékony, kvarcból készült kapilláris cső (6. ábra), amelyet kívülről egy poliimid réteg borít, hogy növelje az ellenállóságát és rugalmasságát. A kapilláris belső átmérője általában 25-100 μm , míg a külső átmérő 350-400 μm között változik. Az elválasztáshoz szükséges nagyfeszültséget elektródák biztosítják. A kapillárisba juttatott minta általában 1-40 nanoliter között mozog, amit a kapillárisba kétféleképpen lehet bejuttatni: (1) Hidrodinamikus injektálással, ahol nyomáskülönbséget alkalmaznak a minta bevezetésére. (2) Elektrokinetikus injektálással, amely elektromos feszültség alkalmazásával történik [60]. A detektáláshoz a kvarc kapilláris védő poliimid rétegét eltávolítják, hogy a kapilláris átlátszóvá váljon és UV fénnel vagy lézerrel megvilágítható legyen.



6. ábra Kapilláris elektroforézis berendezés sematikus ábrája [56]

A kapilláris belsejének rendszeres tisztítása (kondicionálása) kulcsfontosságú a pontos és megbízható eredmények érdekében. Ez mosással történik, például NaOH vagy HCl alkalmazásával, hogy eltávolítsák a felületen adszorbeálódott anyagokat.

1.4.2 Kapilláris elektroforézishez alkalmazható detektorok

A CE-hez kapcsolódóan többféle detektálási módszer is alkalmazható, például:

- UV-látható fényelnyelés
- Fluoreszcencia
- Lézer indukálta fluoreszcencia (LIF)
- Amperometria
- Vezetőképesség-mérés
- Tömegspektrometria

A számítógép feldolgozza a detektor által előállított jelet, majd az értékeket elektroferogram formában ábrázolja. Az elektroferogram LIF esetén az eredményt Relatív Fluoreszcens Egységben (RFU) adja meg a migrációs idő függvényében. Jelenleg a kapilláris elektroforézis az egyik legdinamikusabban fejlődő analitikai módszer, melynek legnagyobb előnye, az ultra-nagy felbontás, a kis mintamennyiség igény (nl), a rövid elválasztásidő, illetve más technikákkal ellenben könnyen automatizálható. További előnyként említhető, hogy az alkalmazott minimális oldatmennyiségekkel egyszerűbb módszerfejlesztést, és gyakorlatilag szerves oldószerektől mentes munkát tesz lehetővé [49]. A CE kisebb mennyiségű mintát és reagenst igényel, mivel a kapillárisok átmérője rendkívül kicsi. Ez különösen előnyös akkor, ha csak korlátozott mennyiségű minta áll rendelkezésre, vagy ha drága reagenseket kell használni. TDK munkám során lézer indukált fluoreszcens detektálással kapcsolt kapilláris elektroforézist alkalmaztam, ahol a kapilláris 40 cm (30 cm effektív hosszúságú) hosszú és 30 μm belső átmérőjű volt. Az elválasztás normál polaritású üzemmódban, elektroosmotikus áramlás (EOF) segítségével történt.

2 Anyagok, eszközök és módszerek

2.1 Reagensek

A munkám során a felhasznált acetonitril, tetrahidrofuran (THF), nátrium cianoborohidrát (NaBH_3CN) (1 M THF-ban), glicerin, dithiothreitol (DTT), cc. ecetsav, tripszin és ammónium-acetát a Sigma Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) cégtől származik. A nátrium-dodecil-szulfát (SDS) és Nonidet P-40 (NP-40) a VWR (Radnor, PA, USA) cégtől került beszerzésre. A PNGase F endoglikozidáz enzim (1,5 IUB egység/ μl) az Asparia Glycomics-től (San Sebastian, Spanyolország) származik. Az APTS (120 mM) fluoreszcens jelölőanyag BioScience Kft-től (Budapest, Magyarország) került beszerzésre.

2.2 Biobank

A kutatás további lépéseéhez a humán agyszövetminták a Debreceni Egyetem Neurológiai Klinikájából, egy jól dokumentált biobankból fognak érkezni, amelyek 1989-2014 között a neurológián, pszichiátrián, idegsebészen különböző neuropszichiátriai rendellenességben elhunyt páciensekből származnak. A minták száma meghaladja a 2300-at, és ezeket formalinban fixálva tárolják. A cél, hogy a minták felhasználásával egy online szövetbankot hozzassunk létre, amely felhasználható különböző alapkutatásokhoz, ezentúl az analizált minták eredményeiből egy adatbázist fejlesszünk, amelyben a glikozilációs módosulások és a betegségek stádiumai közötti összefüggések lesznek megtalálhatóak.

2.3 Mintaelőkészítés

A folyamat célja, hogy a glikánokat tisztán nyerjük ki a szövetmintából, így lehetővé téve azok szerkezeti és funkcionális analizését. A szövetből szike segítségével metszettem ki a vizsgált részt, majd analitikai mérlegen kimértem 2 mg-ot, ezt követően 150 μl HPLC tisztaságú vizet és egy mágneses gyöngyöt adtam hozzá. A glikoproteinek kinyeréséhez a mintákat BeatBox (PreOmics GmbH, Martinsried, Németország) szövet homogenizátorban 3x10 percig magas fokozaton homogenizáltam. Ezután a mintából 40 μl -t pipettáztam egy tiszta eppendorfba, és adtam hozzá 40 μl acetonitrilt, majd a precipitálás után 40 μl etanollal mostam azokat 20 percen keresztül. A precipitálási - és az etanolos mosást követő lépésnél centrifugát használtam (13 500 x g, 5 percen keresztül), hogy könnyedén el tudjam távolítani a felesleges oldószert a mintáimról. A felülúszó eltávolítása után 40 μl TRIS puffert (pH 8) pipettáztam bele. Ezt követően összeállítottam a denaturáló oldatot, amely 30 μl NP-40-ből (0,5%), 5 μl SDS-ből

(5%) és 5 µl DTT-ből (100 mM) állt. A denaturáló oldatból a mintákhoz 4 µl-t pipettáztam majd 70°C-on 15 percig denaturáltam. Ezt követően a mintákhoz 2 µl PNgase F endoglikozidáz enzimet adtam és PCR-be téve zárt kupakkal 37°C-on 2 órán keresztül inkubáltam. A mintát APTS fluorofór festékkel jelöltem, amelyhez redukáló oldatot állítottam össze 160 µl THF-ből, 40 µl NaBH₃CN-ből, 140 µl AcOH-ből, és 60 µl HPLC vízből. Mintánként 1 µl APTS (120 mM) fluoreszcens festéket és 20 µl redukáló oldatot adtam hozzá. 37°C-on nyitott kupakkal egy éjszaka alatt beszárítottam a mintákat termosztát segítségével, elszívó fülke alatt. Ezt követően 100 µl HPLC vizet adtam a mintákhoz, vortex és UH kád segítségével homogenizáltam, centrifugáltam, majd 80 µl-t CE-LIF-el analizáltam.

2.4 A minta analitikai vizsgálata

Az elválasztás során PA800 Plus (Beckman) kapilláris elektroforézis berendezést használtam lézer indukált fluoreszcens detektálással (gerjesztés: 488 nm, emisszió: 520 nm). Az alkalmazott kapilláris hossza az elemzés során 40 cm (30 cm effektív hosszúságú) hosszú és 30 µm belső átmérőjű volt. Az elválasztás normál polaritású üzemmódban, elektroosmotikus áramlás (EOF) segítségével történt. 1 psi nyomással 5 másodperc alatt injektáltam a mintát a kapillárisba, majd 30 kV elektromos potenciál alkalmazása mellett 20°C hőmérsékleten választottam el a komponenseket. A kapillárisban, míg az EOF az anód felé áramlott, addig az APTS festékkel jelölt glikánok háromszoros negatív töltésük miatt a katód felé irányultak. A kisebb molekulatömegű glikánok jelentek meg először a detektor előtt, majd a nagyobb molekulatömegű glikánok az elválasztás végén. A feleslegben jelenlévő APTS molekulák pedig nem érték el a detektort az elválasztás végéig. Egyes mérések kezdetekor 1 psi nyomással 5 másodperc alatt injektáltam BST-t, melynek segítségével a minta komponenseinek elválasztásakor kapott értékek (pl. GU-értékek) megbízhatóbban és pontosabban korrigálhatók, ezáltal növelve a módszer reprodukálhatóságát és megbízhatóságát. Az eredmények kiértékelését a 32Karat (10.1 verzió) szoftvercsomaggal végeztem.

3 Eredmények

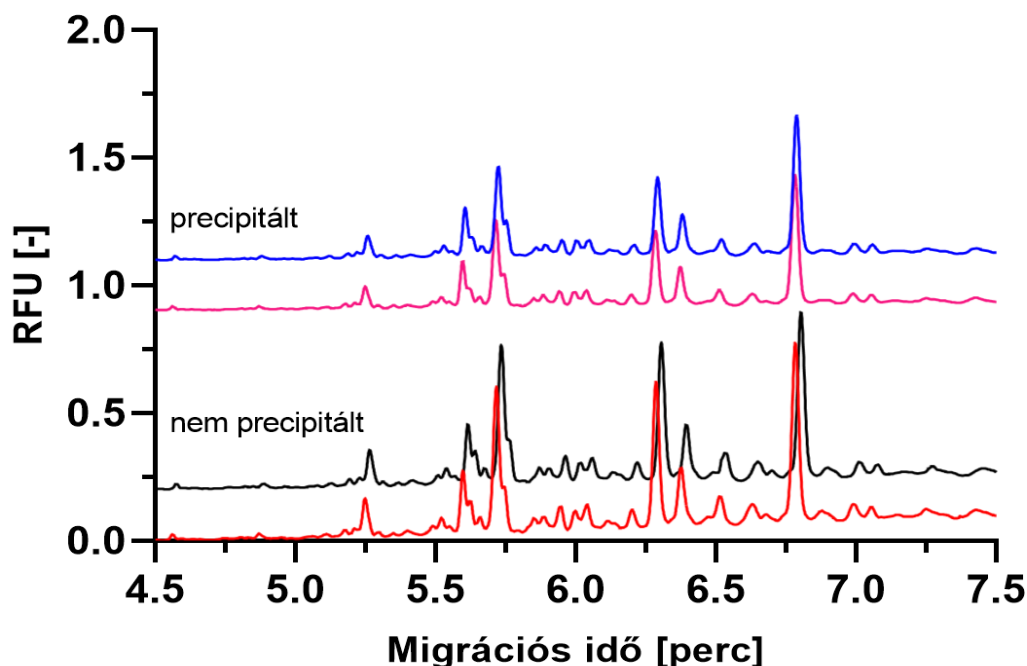
TDK munkám során, sertés agyszövetből származó glikánprofil vizsgáltam és optimalizáltam a mintaelőkészítési protokollt, hogy a CE-t alkalmazva analizálhassam az agyszövetben található *N*-glikánokat. Ez magába foglalja az elválasztás során alkalmazott paraméterek optimalizációját, a minták zsírtalanítási lépéseinek megvalósítását, és a mintaelőkészítési protokoll reprodukálhatóságának és robusztusságának tesztelését.

3.1 A mintaelőkészítési protokoll optimalizálása

Első lépésként a különböző szövetekhez már kidolgozott mintaelőkészítési eljárásokat dolgoztam fel a szakirodalom alapos áttekintésével. A munkám alapját Döncző Boglárka „Formalinnal fixált, paraffinba ágyazott szövetminták *N*-glikánjainak kapilláris elektroforetikus analízise” című cikkében taglalt egér-agyszövet preparálási protokollja adta [61]. Ez alapján először sertésagyból végeztem a tesztméréseket, hogy optimalizálni tudjam a mintaelőkészítési protokollt. Ehhez a biobankban lévő körülmények között tároltam (10%-os formalin oldat) a sertésagymintát, hogy reprezentatív legyen a későbbi mintákhoz. A következő pontokban kifejttem a TDK munkám során fellépő problémákat és az általam alkalmazott megoldásokat, valamint azok eredményeit.

3.1.1 Precipitálás

Elsőként a mintaelőkészítés robusztusságát vizsgáltam, és teszteltem, hogy szükséges-e a fehérjék precipitálása. Ehhez két mintában található fehérjéket acetonitrillel denaturáltam, míg másik kettőt kontrollként kezelve nem adtam hozzájuk precipitálószer. Ezt követően lecentrifugáltam a mintákat, majd azt a következtetést vontam le, hogy a kiindulási protokollban lévő arányok nem megfelelőek a munkámhoz, hiszen a kicsapószer mennyisége olyan soknak bizonyult, hogy még erősebb centrifugálás mellett sem voltam képes az eppendorf cső falához rögzíteni a fehérjéket. Ennek okán a mintaelőkészítéssel nem tudtam tovább haladni, hiszen enélkül a fehérjék hatékony elkülönítése nem volt lehetséges. Korábbi tapasztalatokra és hígítási sorral végzett kísérletek alapján a reagens mennyiségét a felére csökkentve végeztem el újra a kísérletet, mellyel elértem, hogy a fehérjék megfelelően kicsapódtak, és a centrifugálás során stabilan rögzültek az eppendorf cső falához, így a mintaelőkészítést sikeresen be tudtam fejezni. Az ezekből a mérésekből kapott elektroferogrammok összehasonlítása a 7. ábrán látható.

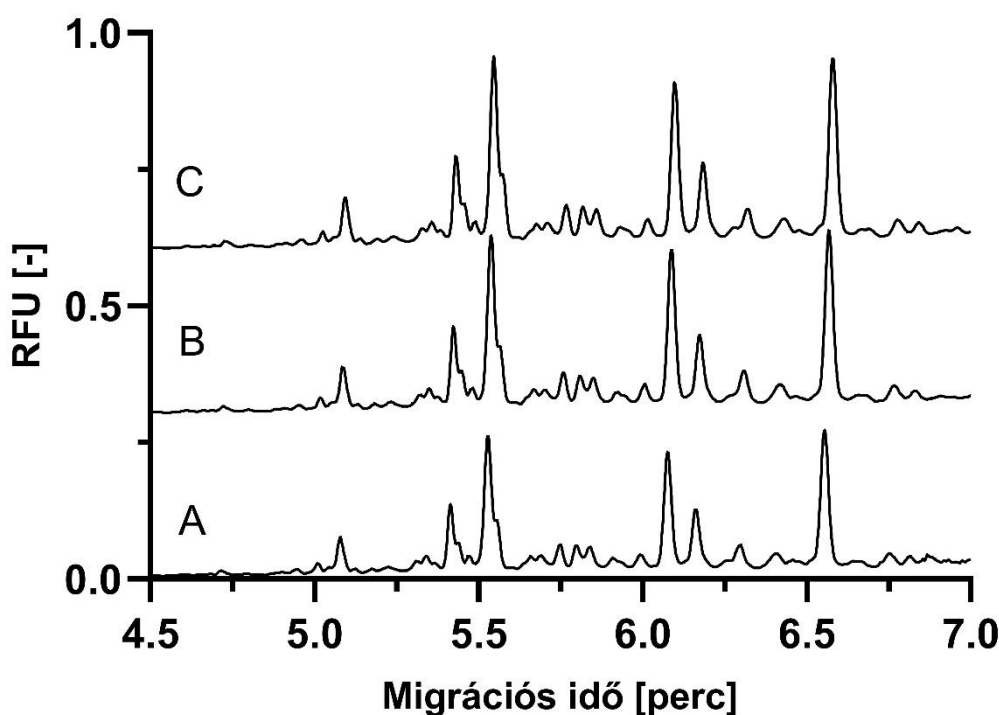


7. ábra Precipitált és nem precipitált szövetminták összehasonlítása

A 7. ábrán a CE-LIF berendezéssel mért négy minta relatív fluoreszcens egységei [RFU] kerültek bemutatásra a migrációs idő függvényében, ahol a kék és rózsaszín elektroferogramok a kicsapott mintákat, míg a piros és fekete elektroferogramok a kezeletlen mintát reprezentálják. Az y tengelyen látható RFU egy relatív mérési egység, amelyet a fluoreszcens tulajdonsággal rendelkező anyagok intenzitásának mérésére használnak. Ez nem egy abszolút mértékegység, hanem az adott mérési körülmények közötti viszonylagos értékeket mutatja, amelyek az adott fluoreszcens anyag által kibocsátott fény intenzitását jelzik. Az így mért elektroferogramok alapján látható, hogy az acetonitrillel precipitált párhuzamos minták jelentős átfedést mutattak a nem precipitálttal szemben, amelyből arra következtettem, hogy a kicsapási lépés fontos a minták reprodukálhatóságának szempontjából, tehát a továbbiakban minden mintaelőkészítésnél alkalmaztam ezt a lépést. Ezt követően azt vizsgáltam, hogy a humán agyminták tárolási körülményei (formalinban való fixálás) hogyan befolyásolhatják a glikánprofilot. Ezért megismételtem az előzőekben leírt mérést formalinfixálás után is.

3.1.2 Formalin fixálás

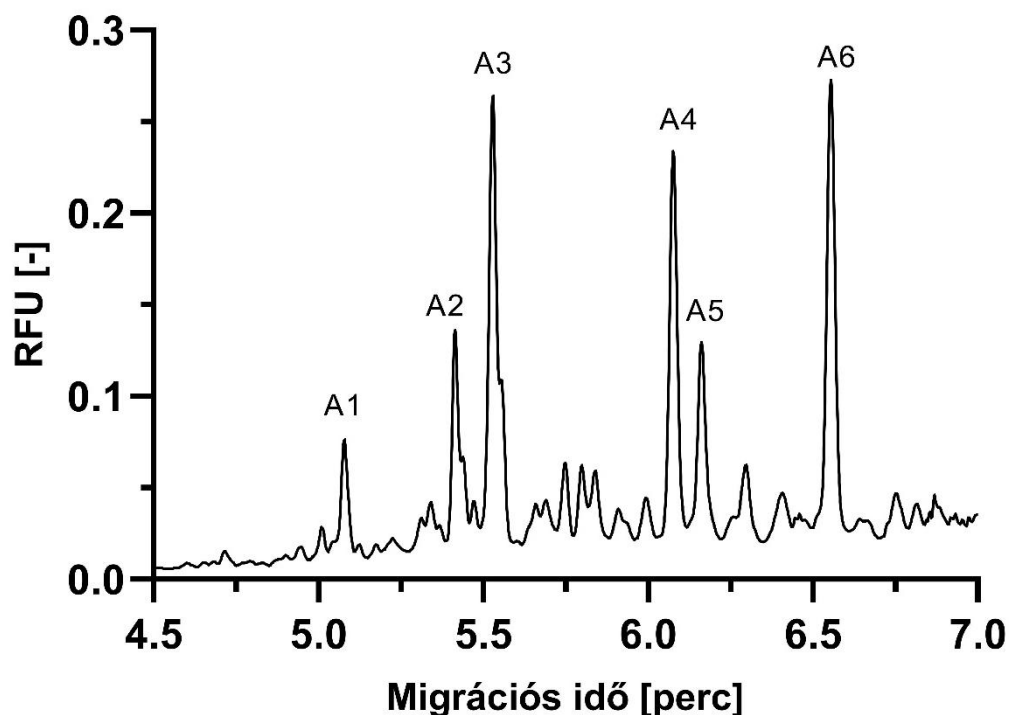
A formalin fixálás célja, hogy megállítsa a biológiai szövetek bomlási folyamatait és stabilizálja azok szerkezetét, ezzel hosszú távon megőrizve a minta morfológiáját és molekuláris integritását. Ez a fixálószer általában 37- 40 m/m %-os formaldehid vizes oldata, amely keresztkötéseket hoz létre a fehérjék között, így biztosítva a szövetek állandóságát és szilárdságát a későbbi analizálásokhoz, beleértve a molekuláris és szövettani vizsgálatokat. Az alkalmazott tesztmintámat 10 V/V %-os formalin oldatban fixáltam, ami 3,7 - 4% formaldehidet tartalmaz foszfát pufferben, hogy a paraméterei megegyezzenek a humán agyszövetek tárolási körülményeivel, majd megismételtem az acetonitriles precipitálást a 3.1.1 fejezetben leírtak alapján. Ennek eredményeit a 8. ábra szemlélteti.



8. ábra Formalinban fixált sertés agyszövet minták N-glikán profilja

Ezzel a kísérlettel a formalinnal történő fixálás hatását vizsgáltam, ahol az ábrán jelölt A, B és C elektroferogrammok párhuzamos méréseket jelölnek ugyanabból a szövetdarabból. Ezek alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a formalin fixálás nem befolyásolta a mintaelőkészítés reprodukálhatóságát, mivel a mért elektroferogrammon nem tapasztaltam szignifikáns eltéréseket, a korábbi még nem formalinban fixált mintából készített mért adatokhoz képest. Emellett a formalin javította az alapvonal minőségét, csökkentve ezzel a jel/zaj arányt. A fennmaradó zaj kiküszöbölésére szükséges volt egy zsírtalanító-mosó lépés alkalmazására a protokollban.

Következő lépésként kiválasztottam azt a 6 csúcsot (A1-A6) amely a legnagyobb jelintenzitást mutatta az agyszövetminták elektroferogramjaiban (9. ábra) és meghatároztam ezeknek a csúcs alatti területét, valamint a csúcsok migrációs idejét.



9. ábra 6 kiválasztott és vizsgált N-glikán csúcs

Ezeknek a csúcs alatti területeknek a pontos értékeit és a kiszámított RSD%-ait a 1. táblázat foglalja össze. Az RSD% (Relatív Szórás, más néven Relatív Standard Deviáció) -al tudjuk megadni, hogy egy adott mérési sorozatban mekkora az átlagtól való eltérés. Ennek segítségével a mérési eredmények pontosságát és megbízhatóságát lehet értékelni. Minél alacsonyabb az RSD%, annál kisebb a szórás, tehát annál robusztusabb a mérés.

1. táblázat Sertés agyszövetből származó N-glikán csúcsok RSD%-a

	Terület			Terület %			Átlag	S.D	%RSD
	#1	#2	#3	#1	#2	#3			
1	9371	11280	12474	5,50	5,25	5,34	5,36	0,126	2,351
2	17809	21768	28107	10,45	10,12	12,03	10,87	1,022	9,405
3	47000	58755	64263	27,57	27,33	27,51	27,47	0,124	0,453
4	34174	45497	46173	20,04	21,16	19,77	20,32	0,738	3,632
5	17994	20933	22874	10,55	9,74	9,79	10,03	0,456	4,550
6	44153	56761	59683	25,90	26,40	25,55	25,95	0,427	1,646

	Mig. idő (perc)			Átlag	S.D	%RSD
	#1	#2	#3			
1	5,078	5,086	5,094	5,09	0,01	0,16
2	5,415	5,424	5,431	5,42	0,01	0,15
3	5,529	5,539	5,547	5,54	0,01	0,16
4	6,076	6,088	6,098	6,09	0,01	0,18
5	6,162	6,174	6,184	6,17	0,01	0,18
6	6,554	6,568	6,58	6,57	0,01	0,20

A migrációs idő és a csúcsterület reprodukálhatósága 0,17 és 3,67 RSD% volt. Tehát a migrációs idő tekintetében szignifikáns különbség nincsen, gyakorlatilag szinte azonos értéket vesznek fel a csúcsok. Míg a csúcsterületek esetében egy minimális eltérés mutatkozik, amely a csúcspontok kijelölésénél vett hibákból adódhat.

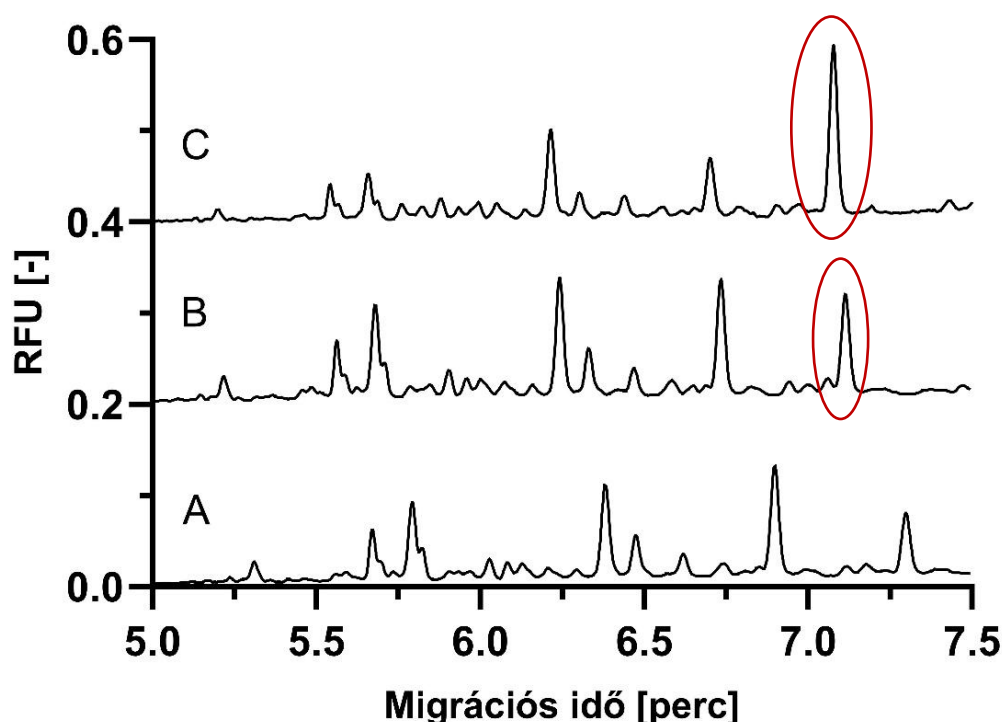
3.1.3 Zsírtalanítási mosás

A legalkalmasabb mosási módszer kidolgozásához több különböző tesztet is elvégeztem. Elsőként készítettem egy referencia mintát, amit kezeletlenül hagytam, majd egy párhuzamos mérést, ahol a mintákat a precipitálási lépés után 20 percig etanollal mostam. Egy korábbi konferencián tartott előadásom során, azt a javaslatot kaptam, hogy a precipitálási lépést és a mosást is etanollal végezzem, hiszen az is egy kiváló fehérjekicsapó reagens, ezért ezt a hipotézist is leteszteltem. A kísérlethez három 2 mg-os darabot vettem a szövetből, majd a szövethomogenizálás után mind a három mintát további három részre osztottam. Így párhuzamosan vizsgálhattam a mintaelőkészítés hatékonyságát és robusztusságát. A mérések könnyebb érthetősége érdekében az alábbi 2. táblázatban foglaltam összes a lépéseket.

2. táblázat Zsírtalanítási mosás lépései

	Precipitálás	Mosás
1. sorozat	Acetonitril	-
2. sorozat	Acetonitril	Etanol
3. sorozat	Etanol	Etanol

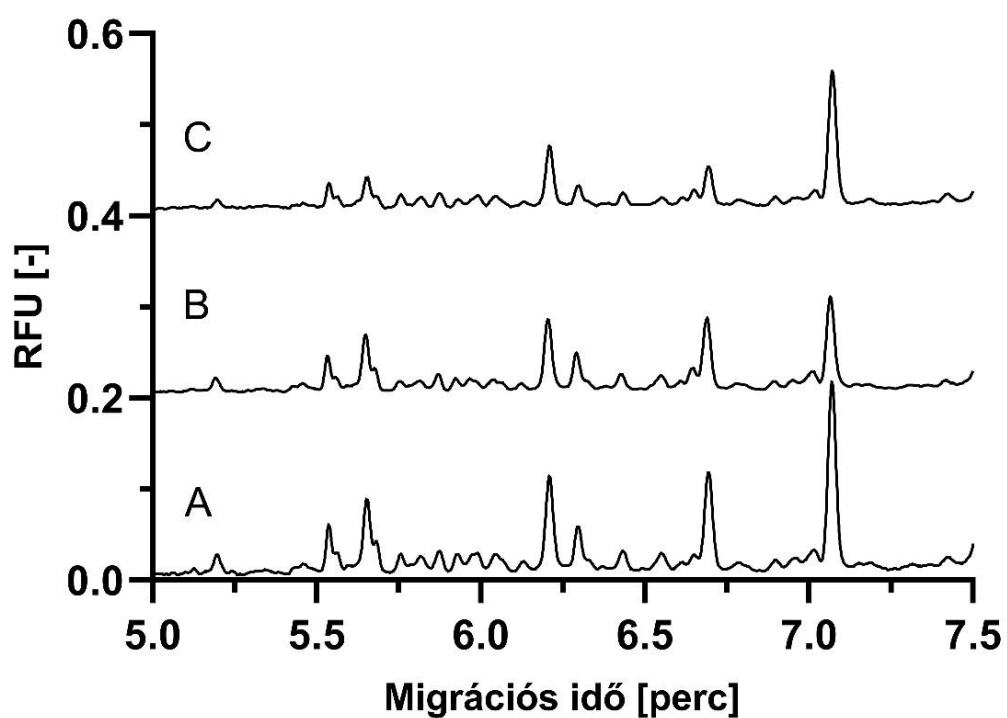
Az első sorozat esetében az acetonitrillel való kicsapást követően nem alkalmaztam mosási lépést, hogy legyen egy viszonyítási alapunk a többi sorozathoz. A következő ábrán a kiindulási szövetből közvetlen egymás mellől vett három, ACN-el precipitált minta elektroferogramja látható.



10. ábra 1. sorozat ACN-el történő precipitálás

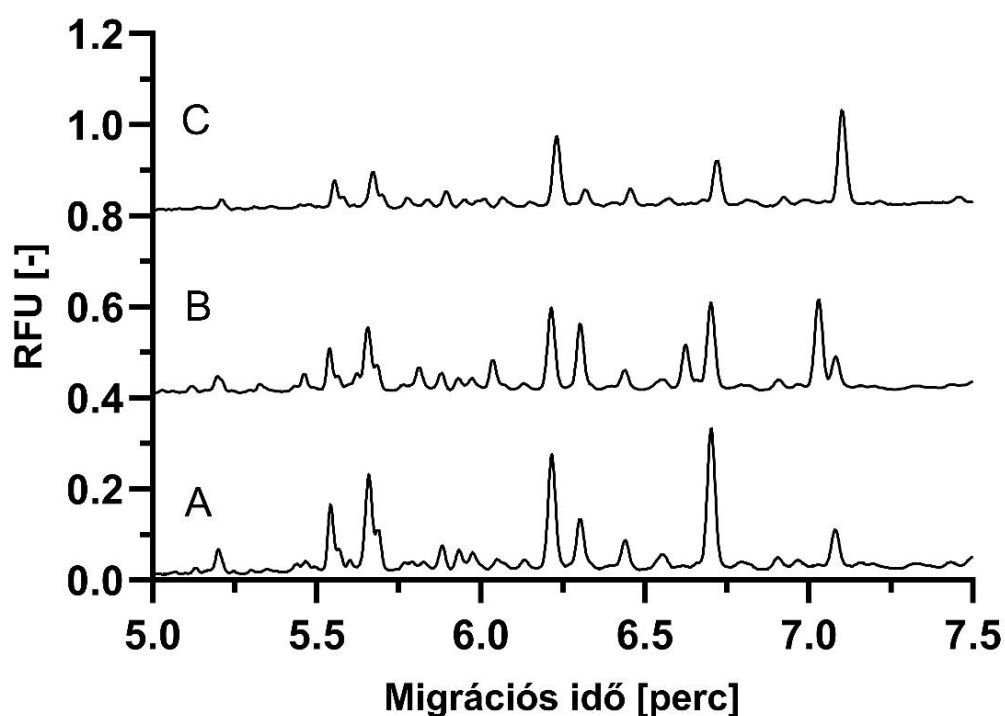
Az azonos mintavételi területekről vett szövetminták elektroferogramjai (A, B és C párhuzamosok) hasonló glikán-profilt mutatnak, azonban nem teljesen párhuzamosak, mivel bizonyos csúcsok arányaiban eltérések figyelhetők meg. Ez azt jelzi, hogy bár a minták általános összetétele hasonló, eltérések figyelhetők meg a mintavételezési hely függvényében. Míg a 10. ábra C elektroferogramján pirossal bekarikázva egy nagyobb csúcsot látunk, addig a B-elektroferogrammon ugyanezen migrációs időnél már két csúcs figyelhető meg. Ez fontos szempont a mintavételezés során, különösen tekintettel a vizsgált neurológiai betegségek esetén egy potenciális biomarker kutatás során.

A második sorozatnál az ACN-el történő kicsapást egy etanolos mosás követte, hogy kiküszöböljem a szövetmintából visszamaradt egyéb molekulák által keltett zajintenzitást. Az eredményeket a 11. ábra szemlélteti. A párhuzamos minták (A, B, C) a sertés agyszövet ugyanazon részéből származnak, mint az első sorozat esetében.



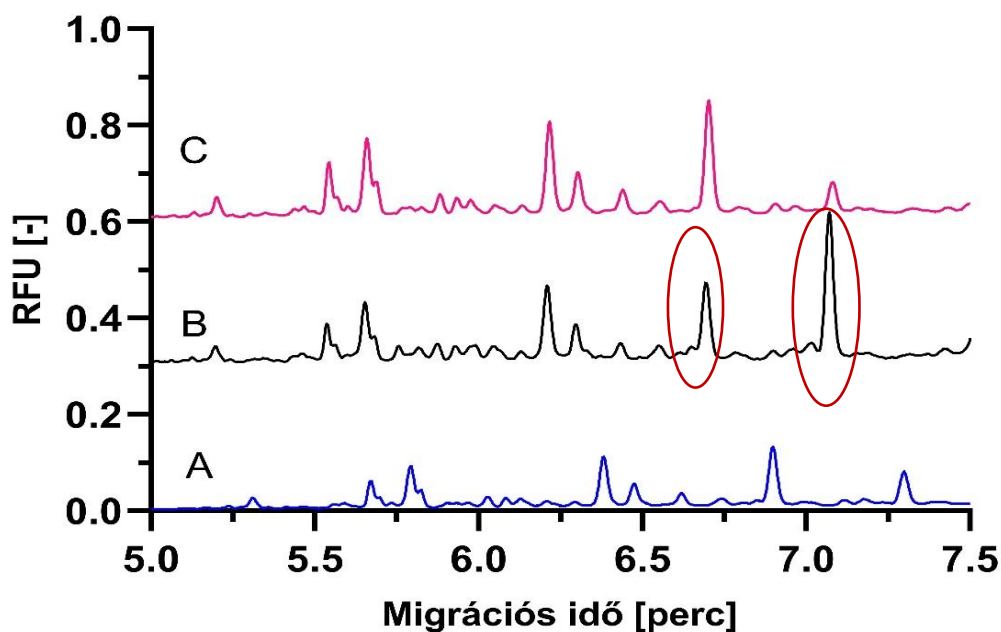
11. ábra 2. sorozat: ACN precipitálás és EtOH mosás

A mérés során, a jel/zaj arány jelentősen lecsökkent köszönhetően az etanol zsírtalanító hatásának. Ezután elkészítettem a harmadik sorozatot, amely során már a precipitálási lépés is etanollal történt, amelyet egy húsz perces etanolos mosás követett. Nagy előnye a módszernek, hogy egyel kevesebb szerves reagenssel kell dolgozni, mint a korábbi sorozatokban. A mérési eredmények a 12. ábrán láthatóak.



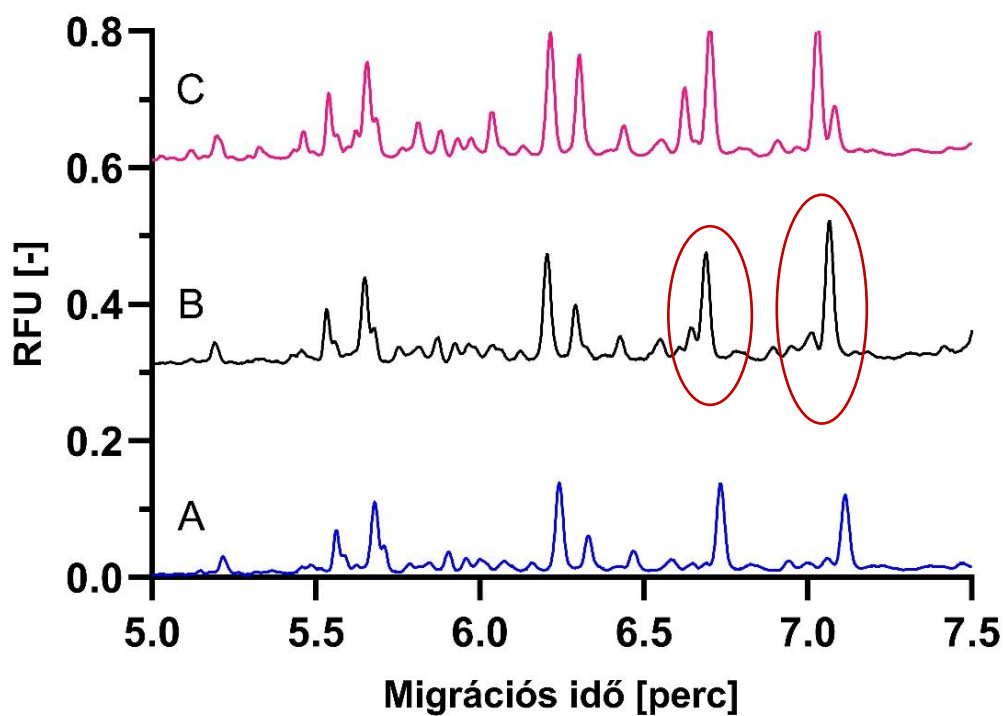
12. ábra 3. sorozat: EtOH precipitálás és EtOH mosás

A 12. ábrán található A, B és C párhuzamos elektroferogrammok ebben az esetben is az eredetileg azonos helyről vett mintákból származó *N*-glikánprofilt reprezentálják, ahol a mintaelőkészítést etanolos precipitálással és etanolos mosással végeztem. A következőkben az alkalmazott három különböző módszer összehasonlítása céljából, az azonos szövetdarabból, de más kezelési módszer alá vetett minták elektroferogramjait ábrázoltam, ahol a kék szín az acetonitrillel precipitált mintákat jelöli, amelynél nem alkalmaztam etanolos mosást (A), a fekete szín az ACN-el precipitált és EtOH-al mosott mintát szemlélteti (B), míg a rózsaszín a mindkét esetben etanollal kezelt mintákat képviseli (C). Az elválasztást követően a kapott csúcsokat normalizáltam egy általam választott referenciacsúcsához képest. A normalizálással az intenzitáskülönbségek egyértelműbbé válnak, és a változások pontosabban tükrözik a minta összetételét vagy a komponensek eltérő arányát, nem pedig az elválasztás során esetlegesen fellépő eltérő körülményeket. A 13. ábra az első szövetdarabból származó eredményeket mutatja, ahol a görbék normalizálása után megfigyelhető, hogy a B elektroferogrammon több egymástól jól elkülöníthető csúcs található (az ábrán pirossal bekarikázva).



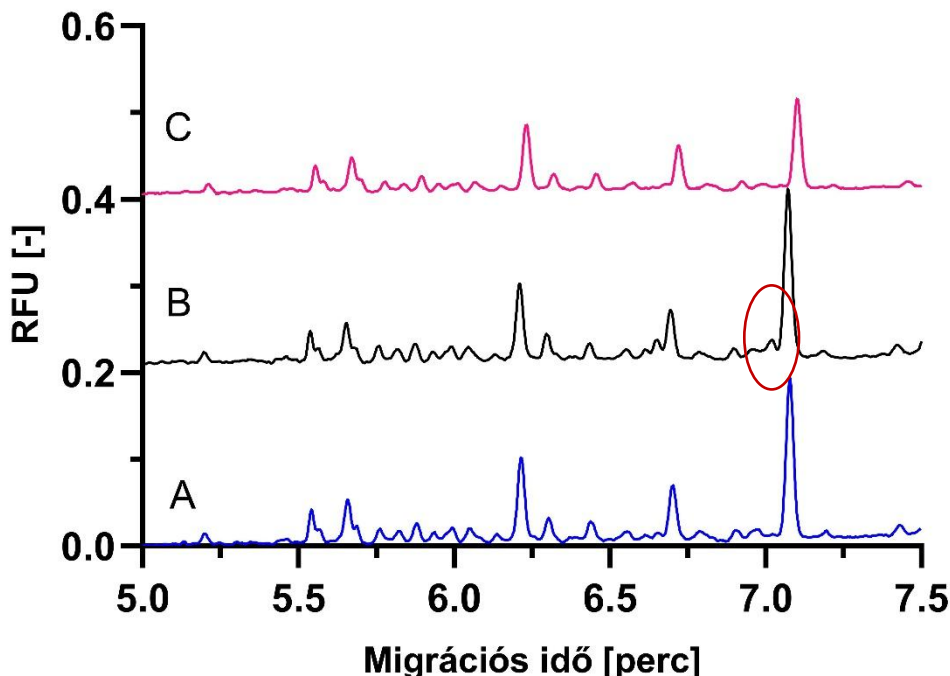
13. ábra Az 1-es szövetminta elektroferogrammjainak összehasonlítása, ahol A: ACN-el precipitált, B: ACN-el precipitált és EtOH-al mosott, C: EtOH-al precipitált és mosott mintákat jelölik

A 14. ábra a második szövetdarabból származó *N*-glikánprofilokat hasonlítja össze, ahol hasonló mintázat volt megfigyelhető, a normalizálást követően a 6,5 perc után több csúcs vált el (ábrán pirossal bekarikázva).



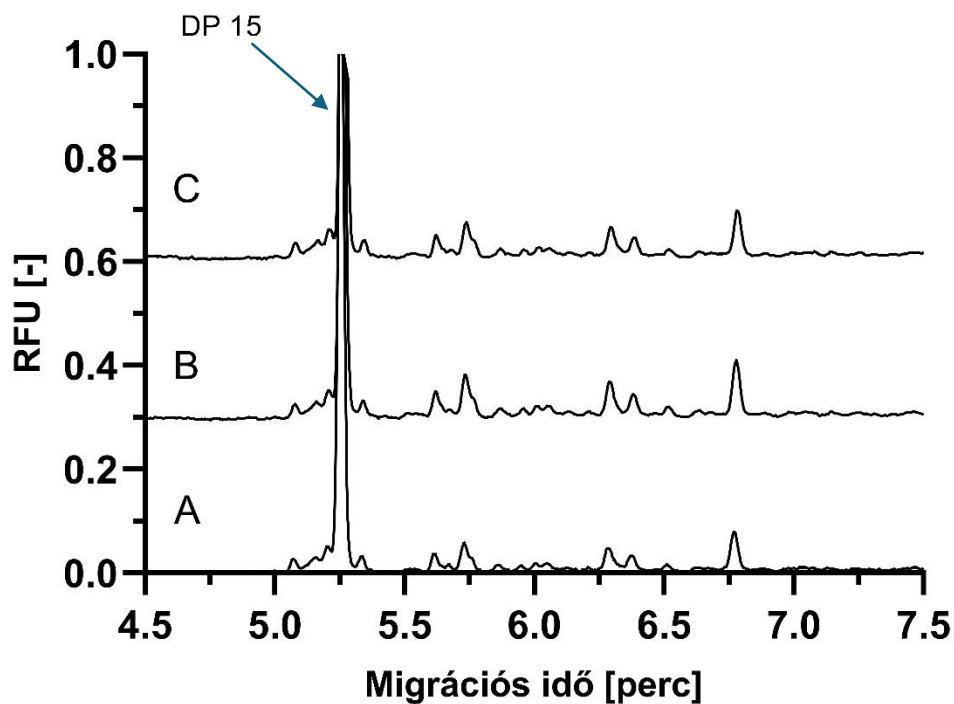
14. ábra A 2-es szövetminta elektroferogrammjainak összehasonlítása, ahol A: ACN-el precipitált, B: ACN-el precipitált és EtOH-al mosott, C: EtOH-al precipitált és mosott mintákat jelölik

A 15. ábrán a harmadik szövetdarabból származó *N*-glikánprofil eredményei láthatók. Megfigyelhető, hogy a B elektroferogrammon (pirossal bekarikázva) a 7. percnél megjelenik egy csúcs, amely a másik két elektroferogrammon (A és C) nem található meg.



15. ábra A 3-as szövetminta elektroferogrammjainak összehasonlítása, ahol A: ACN-el precipitált, B: ACN-el precipitált és EtOH-al mosott, C: EtOH-al precipitált és mosott mintákat jelölök

Az elektroferogrammok analizálása alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a legmegfelelőbb mintaelőkészítési módszer az acetonitrillel végzett precipitálás, amelyet etanolos mosás követ. Ezzel a módszerrel nagyfokú reprodukálhatóság érhető el és nagy felbontású csúcsokat kapunk, ami arra utal, hogy ezzel a mintaelőkészítési technikával hatékonyabb elválasztást érhetünk el, amely pontosabb eredményekhez vezethet. A mintaelőkészítési módszer robusztusságát ismételt párhuzamos méréssel is igazoltam, amely a módszer megbízhatóságát támasztotta alá. A 16. ábra ennek az összehasonlításnak az eredményeit szemlélteti.



16. ábra Belső standardel mért minták elektroferogramjai

A mérés során belső standardet (DP4 és DP15) injektáltam a mintához az elválasztás során, hogy a kapott eredmények kiértékelését el tudjam végezni. A csúcsok azonosítása folyamatban van, ez maltodextrin létra segítségével fog megtörténni a jövőben, amely referenciapontként szolgál a csúcsok pontos felismerésében és azok molekuláris azonosításában, így biztosítva a minta komponenseinek precíz meghatározását.

4 Összefoglalás

A szakirodalomban jelenleg korlátozott számú publikáció található az agyszövetekben detektált *N*-glikánok struktúrájára vonatkozóan, így a glikán analízis ezen megközelítése újdonságnak számít. A TDK munkám során sertés agyszövet *N*-glikán profiljának meghatározásához optimalizáltam a mintaelőkészítési protokollt lézer indukált kapilláris elektroforézissel való mérésekhez. A teszt méréseket sertésagyból származó szövetmintákon végeztem el. Azért, hogy a mintaelőkészítési protokoll a humán agyszövetből származó szövetminták *N*-glikán analíziséhez is alkalmas legyen az agyszövetet 10%-os formalin oldatban fixáltam, ezzel azonos körülményeket teremtve a humán minták tárolásához. Ezt követően a mintaelőkészítés robusztusságát vizsgáltam, és teszteltem szükséges-e egy precipitálási lépés. Miután kísérletekkel alátámasztottam ennek szükségességét, teszteltem milyen módszerrel lehetne optimálisan elvégezni a zsírtalanítást. A kapott elektroferogrammok kiértékelése alapján arra a konklúzióra jutottam, hogy a megfelelő delipidálás eléréséhez az acetonitrillel történő mosás után egy 20 perces etanollal történő mosást kell elvégezni. Az elkészült munkafolyamatot ezt követően szeretném egészséges humán agyszöveten tesztelni, elsősorban azért, hogy megbizonyosodhassunk róla emberi mintákon is alkalmazható a protokoll, valamint, hogy legyen egy megfelelő kontroll eredményem, amit később a neurológiai rendellenességekben elhunyt betegekből származó agyszövet mintákkal össze tudjak hasonlítani. További kutatásom során a kidolgozott munkafolyamatot felhasználva a „(V4) - Korea Joint Research Program 2023” szempontjából legígéretesebb mintákat tervezem analizálni glikomikai szempontból úgynevezett mapping technikával, hogy nagyfelbontású képet kapjak az agy különböző területeiről származó glikánprofilról, hiszen a cukorstruktúrák megváltozása potenciális biomarkerként funkcionálhat, számos neurológiai betegség esetében. A humán minták feldolgozását követően adatbázist hozunk létre az összegyűjtött adatokból, hogy eredményeinket felhasználhatóvá tegyük a további kutatásokhoz. A szöveteken végzett vizsgálat ugyanis értékes információt szolgáltat a potenciális gyógyszerfejlesztés területén, és elősegítheti a célzott terápiák hatékonyságának optimalizálását.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek Dr. Járvás Gábornak, Török Rebekának és Prof. Dr. Guttman Andrásnak a kutatócsoport vezetőjének, amiért lehetőséget adtak arra, hogy dolgozatomat a Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet, Transzlációs Glikomika Kutatócsoport keretein belül készíthettem el. Ez a munka a Pannon Egyetemért Alapítvány Tudományos Diákköri Ösztöndíj és a (V4) -Korea Joint Research Program 2023 által finanszírozott szakmai támogatással készült.

5 Irodalomjegyzék

1. Organization, W.H., *Neurological disorders: public health challenges*. 2006: World Health Organization.
2. Organization, W.H., *The World Health Report 2001: Mental health: new understanding, new hope*. 2001.
3. Makkar, R., et al., *Nutraceuticals in neurological disorders*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(12): p. 4424.
4. Rosenberg, R.N. and J.M. Pascual, *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease: Volume 1*. 2020: Academic press.
5. Seng, E.K., P.R. Martin, and T.T. Houle, *Lifestyle factors and migraine*. The Lancet Neurology, 2022. **21**(10): p. 911-921.
6. Dumurgier, J. and C. Tzourio, *Epidemiology of neurological diseases in older adults*. Revue neurologique, 2020. **176**(9): p. 642-648.
7. Levine, D.A., et al., *Sex differences in cognitive decline among US adults*. JAMA network open, 2021. **4**(2): p. e210169-e210169.
8. Scheltens, P., et al., *Alzheimer's disease*. Lancet, 2021. **397**(10284): p. 1577-1590.
9. Organization, W.H., *Global status report on the public health response to dementia*. 2021.
10. Pless, A., et al., *Understanding neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: challenges and advances in diagnosis and treatment*. Frontiers in Neuroscience, 2023. **17**: p. 1263771.
11. Aguzzoli, C.S., et al., *Neuropsychiatric symptoms and microglial activation in patients with Alzheimer disease*. JAMA Network Open, 2023. **6**(11): p. e2345175-e2345175.
12. Lopez-Lee, C., et al., *Mechanisms of sex differences in Alzheimer's disease*. Neuron, 2024.
13. Griffin, P., et al., *Developments in understanding early onset Alzheimer's disease*. Alzheimer's & Dementia, 2023. **19**: p. S126-S131.
14. Aspö, M., et al., *Transitions: Experiences of younger persons recently diagnosed with Alzheimer-type dementia*. Dementia, 2023. **22**(3): p. 610-627.
15. Rahmani, R., et al., *Age-dependent sex differences in perineuronal nets in an APP mouse model of Alzheimer's disease are brain region-specific*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**(19): p. 14917.

16. Sehara, U., et al., *Effects of Sleep Deprivation on Brain Atrophy in Individuals with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease*. Ageing research reviews, 2024: p. 102397.
17. Khan, S., K.H. Barve, and M.S. Kumar, *Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease*. Curr Neuroparmacol, 2020. **18**(11): p. 1106-1125.
18. Organization, W.H., *Intersectoral global action plan on Epilepsy and other neurological disorders 2022–2031*. 2023: World Health Organization.
19. Porsteinsson, A.P., et al., *Diagnosis of early Alzheimer's disease: clinical practice in 2021*. The journal of prevention of Alzheimer's disease, 2021. **8**: p. 371-386.
20. Jack Jr, C.R., et al., *Revised criteria for diagnosis and staging of Alzheimer's disease: Alzheimer's Association Workgroup*. Alzheimer's & Dementia, 2024.
21. Foundation, F.C.F.A.s.R.; Available from: <https://www.alzinfo.org/brain/>.
22. Schaffer, C., et al., *Biomarkers in the Diagnosis and Prognosis of Alzheimer's Disease*. J Lab Autom, 2015. **20**(5): p. 589-600.
23. Dafre, R. and P. Wasnik Sr, *Current diagnostic and treatment methods of Alzheimer's disease: A narrative review*. Cureus, 2023. **15**(9).
24. Johnson, K.A., et al., *Brain imaging in Alzheimer disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(4): p. a006213.
25. Florean, I., et al., *Using the ATN system as a guide for the neuropsychological assessment of Alzheimer's disease*. Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology, 2021. **43**(9): p. 926-943.
26. Gauntz, S., L.O. Tjernberg, and S. Schedin-Weiss, *The N-glycan profile in cortex and hippocampus is altered in Alzheimer disease*. J Neurochem, 2021. **159**(2): p. 292-304.
27. Lauc, G., et al., *Mechanisms of disease: The human N-glycome*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1860**(8): p. 1574-82.
28. Sarhadi, V.K. and G. Armengol, *Molecular biomarkers in cancer*. Biomolecules, 2022. **12**(8): p. 1021.
29. Scott, E. and J. Munkley, *Glycans as Biomarkers in Prostate Cancer*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(6).
30. Muthana, S.M., C.T. Campbell, and J.C. Gildersleeve, *Modifications of glycans: biological significance and therapeutic opportunities*. ACS chemical biology, 2012. **7**(1): p. 31-43.

31. Zhao, Y.Y., et al., *Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer*. Cancer science, 2008. **99**(7): p. 1304-1310.
32. Potapenko, I.O., et al., *Glycan-related gene expression signatures in breast cancer subtypes; relation to survival*. Molecular oncology, 2015. **9**(4): p. 861-876.
33. Lemmers, R.F.H., et al., *IgG glycan patterns are associated with type 2 diabetes in independent European populations*. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2017. **1861**(9): p. 2240-2249.
34. Mészáros, B., et al., *Comparative analysis of the human serum N-glycome in lung cancer, COPD and their comorbidity using capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography B, 2020. **1137**: p. 121913.
35. Knežević, A., et al., *Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans*. Glycobiology, 2010. **20**(8): p. 959-969.
36. Krištić, J., et al., *Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2014. **69**(7): p. 779-89.
37. Lebrilla, C.B. and H.J. An, *The prospects of glycan biomarkers for the diagnosis of diseases*. Molecular bioSystems, 2009. **5**(1): p. 17-20.
38. Varki, A., et al., *Essentials of Glycobiology [internet]*. 2015.
39. Li, Y., et al., *The importance of glycans of viral and host proteins in enveloped virus infection*. Frontiers in Immunology, 2021. **12**: p. 638573.
40. Szeberényi, J., *Molekuláris sejtbológia. Dialóg Campus Kiadó-Nordex Kft.* 2014, Budapest-Pécs.
41. Suzuki, T., et al., *N-glycosylation/deglycosylation as a mechanism for the post-translational modification/remodification of proteins*. Glycoconjugate journal, 1995. **12**: p. 183-193.
42. Torok, R., et al., *The effect of sample glucose content on PNGase F-mediated N-glycan release analyzed by capillary electrophoresis*. Molecules, 2022. **27**(23): p. 8192.
43. Bodnar, J., et al., *Enzymatic removal of N-glycans by PNGase F coated magnetic microparticles*. Electrophoresis, 2016. **37**(10): p. 1264-1269.
44. Reider, B., M. Szigeti, and A. Guttman, *Evaporative fluorophore labeling of carbohydrates via reductive amination*. Talanta, 2018. **185**: p. 365-369.
45. Farsang, R., et al., *Capillary zone electrophoresis of 8-aminopyrene-1, 3, 6-trisulfonic acid labeled carbohydrates with online electrokinetic sample cleanup*. Analytical Chemistry, 2023. **95**(45): p. 16459-16464.

46. Szigeti, M. and A. Guttman, *Automated N-glycosylation sequencing of biopharmaceuticals by capillary electrophoresis*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 11663.
47. Guttman, A., *High-resolution carbohydrate profiling by capillary gel electrophoresis*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 461-2.
48. Akash, M.S.H., et al., *High performance liquid chromatography*. Essentials of pharmaceutical analysis, 2020: p. 175-184.
49. Helander, A., et al., *Comparison of HPLC and capillary electrophoresis for confirmatory testing of the alcohol misuse marker carbohydrate-deficient transferrin*. Clinical chemistry, 2005. **51**(8): p. 1528-1531.
50. Shah, M., et al., *Capillary electrophoresis methods for impurity profiling of drugs: A review of the past decade*. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2022. **12**(1): p. 15-28.
51. Snyder, L.R., J.J. Kirkland, and J.W. Dolan, *Introduction to modern liquid chromatography*. 2011: John Wiley & Sons.
52. Tiselius, A., *A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures*. Transactions of the Faraday Society, 1937. **33**: p. 524-531.
53. Ta, H.Y., et al., *Twenty years of amino acid determination using capillary electrophoresis: A review*. Analytica chimica acta, 2021. **1174**: p. 338233.
54. Laube, H., J. Boden, and R. Schneider, *Capillary electrophoresis method for the analysis of organic acids and amino acids in the presence of strongly alternating concentrations of aqueous lactic acid*. Bioprocess Biosyst Eng, 2017. **40**(7): p. 981-988.
55. Rathore, A.S., *Joule heating and determination of temperature in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography columns*. Journal of Chromatography A, 2004. **1037**(1-2): p. 431-443.
56. Lu, G., et al., *Capillary Electrophoresis Separations of Glycans*. Chem Rev, 2018. **118**(17): p. 7867-7885.
57. Petersen, J.R., et al., *Capillary electrophoresis and its application in the clinical laboratory*. Clinica Chimica Acta, 2003. **330**(1-2): p. 1-30.
58. Piñero, M.Y., R. Bauza, and L. Arce, *Thirty years of capillary electrophoresis in food analysis laboratories: Potential applications*. Electrophoresis, 2011. **32**(11): p. 1379-1393.
59. Wang, X., et al., *Recent advances in vitamins analysis by capillary electrophoresis*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2018. **147**: p. 278-287.

60. Ciura, K., et al., *Evaluation of sample injection precision in respect to sensitivity in capillary electrophoresis using various injection modes*. Journal of separation science, 2017. **40**(5): p. 1167-1175.
61. Donczo, B., G. Kiraly, and A. Guttman, *Effect of the elapsed time between sampling and formalin fixation on the N-glycosylation profile of mouse tissue specimens*. Electrophoresis, 2019. **40**(23-24): p. 3057-3061.