

Miskolci Egyetem

Anyag- és Vegyészmérnöki Kar



SZAKDOLGOZAT

Pap Martin Leon

2024

Miskolci Egyetem
Anyag és Vegyészmérnöki Kar
Kémiai Intézet

**Appendicitis betegséggel diagnosztizált szérummintákból származó IgG
izolálása és annak glikozilációs mintázatának feltérképezése**

SZAKDOLGOZAT

Készítette: Pap Martin Leon
Konzulens(ek): Dr. Váradi Csaba
Dojcsák Dalma

2024

Szakedolgozat feladatkiírás

Pap Martin Leon Vegyész-mérnök nappali tagozatos hallgató részére

Dolgozat címe:

Appendicitis betegséggel diagnosztizált széruminákból származó IgG izolálása és annak glikozilációs mintázatának feltérképezése automatizált mintaelőkészítési protokollal

Elvégzendő feladatok:

- Foglalja össze a glikoziláció vizsgálatának a lehetőségeit és hasonlítsa össze a különböző műszeres analitikai technikákat.
- Mutassa be a glikoziláció vizsgálatához szükséges mintaelőkészítés lépéseit valamint a folyadék-kromatográfiás vizsgálat körülményeit.
- Vizsgálja meg szérumfehérjék glikozilációs mintázatait gyerekkori vakbélgyulladás és ezekkel nemben és korban egyező kontroll páciensek esetében.
- Azonosítsa az egyes glikánstruktúrákat a tömegspektrometriás fragmentációjuk alapján.
- Végezzen statisztikai elemzést, mely szerkezetek aránya változott szignifikánsan.

A szakdolgozat leadási határideje: 2024. december 2.

A szakdolgozat terjedelme: minimum 40, maximum 50 A/4 oldal

Belső konzulens: Dr. Váradí Csaba, tudományos főmunkatárs, Miskolci Egyetem

Miskolc, 2024. április 22.

Prof. Dr. Viskolcz Béla
intézetigazgató

Igazolás

Alulírott Pap Martin Leon (Neptun kód: A5YDK3, született: Mezőkövesd, 2001.06.11) igazolom, és büntetőjogi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a leadott szakdolgozat a saját munkám.

Miskolc, 2024.12.02

Pap Martin Leon, hallgató

Az igazolást átvettem.

Miskolc, 2024.12.02

Prof. Dr. Viskolcz Béla
intézetigazgató

Alulírott Pap Martin Leon (Neptunkód: A5YDK3, szül.hely: Mezőkövesd 2001.06.11) ezúton nyilatkozom, hogy a dolgozat nem tartalmaz a tudományos etikát, valamint vállalatok és intézmények érdekeit sértő bizalmas információkat. Dolgozatomat az Egyetemi Könyvtár részére mind elektronikusan-, mind nyomtatott formában átadható, és annak tartalma a Szerző nevének és a Dolgozat címének feltüntetésével nyilvános tárhelyre feltölthető.

Miskolc, 2024.12.02

Pap Martin Leon, hallgató

Az igazolást átvettem.

Miskolc, 2024.12.02

Prof. Dr. Viskolcz Béla
intézetigazgató

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom konzulenseimnek Dr. Váradi Csabának és Dojcsák Dalmának elsősorban lehetőséget hogy elkészíthessem a dolgozatomat. Emellett hálás vagyok a dolgozatírás során nyújtott folyamatos segítségért, támogatásért, tanácsért, illetve a segítségnyújtást és türelmet, ha elakadtam vagy lassan haladtam.

Köszönettel tartozom családomnak, akik végig támogattak, és ott voltak mikor rosszabb napjaim voltak, illetve próbáltak mindig a kedvembe járni, minden módon segíteni, hogy sikeresen megírjam a dolgozatot.

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	1
2. Bevezetés.....	2
3. Irodalmi áttekintés.....	4
3.1. Glikoziláció	4
3.1.1. N-glikoziláció	4
3.2. Glikoproteinek és azok szerepe a gyulladásos betegségekben.....	6
3.2.1 Glikoproteinek.....	6
3.2.2. IgG glikozilációja	7
3.3. N-glikoziláció szerepe a gyulladásos betegségekben.....	8
3.4. Analitikai vizsgálatok a glikomika területén	9
3.4.1. Folyadékkromatográfia	9
3.4.1.1. Ultranagy-nyomású folyadékkromatográfia (UPLC)	10
3.4.2. Tömegspektrometria (MS).....	11
4. Anyagok	12
4.1. Vegyszerek.....	12
4.2. Szérum minták.....	12
5. Módszerek	13
5.1. IgG kisérdése szérumból Protein G oszloppal	13
5.2. Protein G oszlop regenerálása	14
5.3. Glicin-HCl-ben lévő IgG minta puffercseréje	15
5.4. Fehérje minták koncentrációjának meghatározása	15
5.4.1. Minták koncentrációjának mérése NanoDrop berendezéssel	16
5.4.2. Minták koncentrációjának mérése Bradford-reagenssel.....	16
5.5. SDS-PAGE	17
5.5.1. Gélöntés	18
5.5.2. Mintafelvitel.....	19

5.5.3. Gélfestés és gémosás.....	20
5.6. N-glikán minta előkészítés folyamata	20
5.6.1. Enzimatis glikán felszabadítás	20
5.6.2. Fluoreszcens jelölés	20
5.6.3. Glikán tisztítás MNP-vel.....	21
5.7. Glikán analízis UPLC-MS módszerrel	21
5.8. Kiértékelő szoftverek, statisztikai tesztek	22
5.8.1. Mann-Whitney kétmintás U-próba	22
5.8.2. Heatmap analízis	23
5.8.3. PCA analízis	23
5.8.4. Boxplot ábrázolás.....	24
6. Célkitűzések	25
7. Eredmények.....	26
7.1. NiFe ₂ O ₄ -NH ₂ MNP-oldat előtesztelése izolált IgG tisztításához	26
7.2. Protein G oszlop tesztelése szérumban lévő IgG izolálására	28
7.3. Gyermekkori vakbélgyulladás és kontroll csoportok szérumban lévő IgG izolálása	29
7.4. Izolált IgG minták glikozilációs analízise és statisztikai eredményei	31
7.4.1. Mann-Whitney-kétmintás U-próba	32
7.4.2. Heatmap analízis	34
7.4.3. PCA analízis	35
8. Összefoglalás.....	37
9. Hivatkozások jegyzéke.....	39
10. Ábra- és Táblázatjegyzék	43
11. Mellékletek	44

1. Rövidítések jegyzéke

AMPER - Ammónium-peroxo-diszulfát

Asn - Aszparagin

CE - Kapilláris elektroforézis (Capillary electrophoresis)

ER - Endoplazmatikus retikulum

Fuc - Fukóz

IgG - Immunoglobulin G

Man - Mannóz

Gal - Galaktóz

MALDI MS/MS - Mátrixasszisztált lézeres deszorpciós/ionizációs tömegspektrometria (Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry)

HILIC - Hidrofil kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfia (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)

TEMED - tetrametilén-diamin

SDS-PAGE - Nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid-gél elektroforézis (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

MNP - Mágneses nanorészecskék (Magnetic nanoparticles)

Ser - Szerin

Thr - Treonin

TRIS - Tris-hidroximetil-aminometán

HPLC - Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography)

GlcNAc - N-acetil-D-glükózamin

2. Bevezetés

Az Appendicitis a leggyakoribb hasi beavatkozást igénylő műtét a világon. Évente 11 eset jut 10000 főre, míg a 15-30 év közöttiek körében ez a szám 23 eset évente [1]. A leggyakoribb tünetek közé tartozik a hasi fájdalom, étvágytalanság, hányinger, enyhe láz [2]. Az esetek túlnyomó többségében műtéti beavatkozás szükséges. A diagnózis felállítása számos kihívással néz szembe, mivel tünetek alapján nem lehet egyértelműen megállapítani az appendicist. ezért gyakori esetek a félrediagnosticszálások, amelyek szövődményekkel járhatnak [3]. A glikoproteinek a glikokonjugátumok közé tartozó módosított fehérjék. A glikoproteinek egy poszttranszlációs módosulás révén jönnek létre, amit glikozilációnak nevezünk. A folyamat során egy cukor egységekből álló oligoszacharid lánc (glikán) kapcsolódik egy peptid lánc meghatározott aminosavjához. Annak függvényében, hogy milyen aminosav szekvenciához kapcsolódik a glikán molekula, kétféle glikoziláció különböztethető meg. N-glikozilációról beszélünk, ha a kapcsolódó aminosavak szekvenciája Asn-X-Ser/Thr, ahol a glikán az aszparagin (Asn) oldalláncához kapcsolódik. O-glikozilációnál szerin, vagy treonin oldalláncához kapcsolódik, amely mellett bármilyen aminosavval kapcsolódhat. Az glikán molekula fehérjéhez történő kapcsolódása az endoplazmatikus retikulum (ER) és Golgi-készülék sejtorganelumaiban játszódik le. A folyamatot glikozilációnak, az eredményt pedig glikoproteineknek nevezzük. A glikoproteinek olyan makromolekulák, amelyek részt vesznek a sejt-sejt kölcsönhatásokban, a fehérje hajtogatásában (folding), illetve azok végső térszerkezetének a kialakításában [4]. A glikoproteinek antigén szerepe kiemelkedő az immunválaszok kiváltásában, mivel a felszínükön lévő specifikus szénhidrátstruktúrák lehetővé teszik, hogy az immunrendszer felismerje őket. Például, a vírusok, mint a HIV, gyakran használják a glikoproteineiket antigénként, hogy elkerüljék a gazda immunválaszát [5]. Az emberi szervezetben számos helyen előfordulnak N-glikozilált fehérjék, ilyen a keringési rendszerünk is. A vérben legnagyobb koncentrációban jelen levő glikoproteinek, a transzferrinek, vagy az immunoglobulinok. Az immunoglobulinok az elsődleges immunválaszra megjelenő védekező molekulák a szervezetben, amit antitestnek nevezünk. Az immunoglobulinoknak többféle típusait különböztethetjük meg: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, melyek közül az IgG a legnagyobb koncentrációban előforduló antitest. Az IgG glikozilációjának vizsgálata széleskörűen alkalmazott módszer, mivel gyulladáshoz vezető folyamatok hatására jelentős változások következnek be annak glikozilációs mintázatában. Ezen változások befolyásolják az IgG molekulák antigén felismerő képességét, és hozzájárulnak az immunválasz szabályozásához. A glikozilációs profilok elemzése lehetőséget ad a különböző

gyulladásos betegségek diagnosztizálására és prognosztizálására, mivel a glikozilációs változások jelző szerepet játszhatnak a betegség állapotának és kimenetelének előrejelzésében. Az N-glikoziláció vizsgálatára a leggyakrabban használt módszer az ultra nagy nyomású folyadékkromatográfia (UPLC), és a kapilláris elektroforézis (CE). Ezek gyakran kerülnek kombinálásra tömegspektrométerrel (MS). Az MS lehetővé teszi, hogy a HPLC-vel, vagy CE-vel elválasztott glikánokról mennyiségi és szerkezeti tulajdonságokat tudjunk meg, ami által egy humán szérum minta teljes glikán-mintázata feltérképezhető, ami által összehasonlító vizsgálatokat lehet végezni egészséges és beteg személyek között.

3. Irodalmi áttekintés

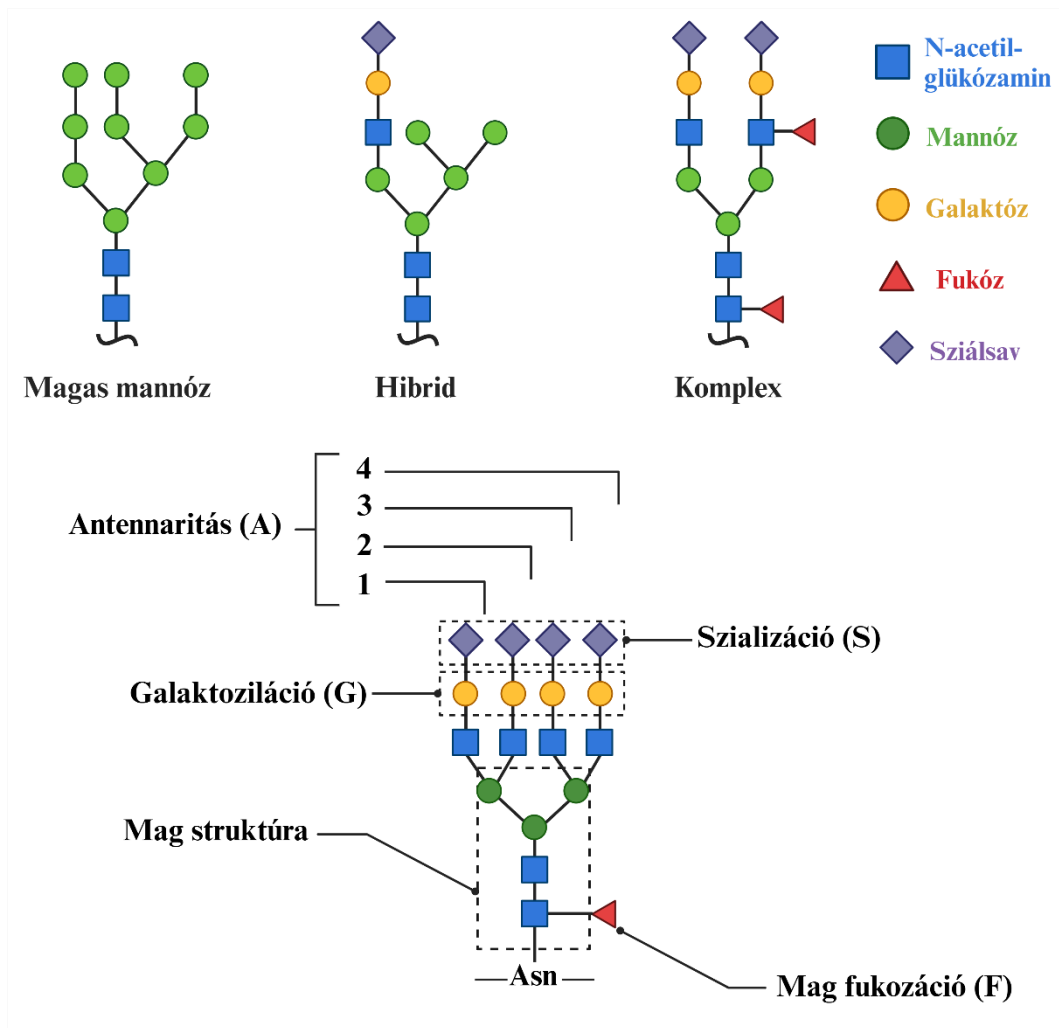
3.1. Glikoziláció

A poszttranszlációs módosulások során a fehérjék különböző funkciós csoportokkal kapcsolódnak össze, melynek eredménye, hogy fehérjék komplexitása növekszik. A poszttranszlációs módosulások száma ma négyszázra tehető amelyek közül a leginkább kutatottak a nitráció, szumoiláció, oxidáció, ubiquitinálás, hidroxiláció, és a glikoziláció [6]. A glikoziláció minden eukarióta sejtben előforduló poszttranszlációs módosulás, amely fontos funkciót tölt be például a fehérje stabilitásának növelésében, a fehérje feltekeredésének folyamatában, vagy a sejt-sejt közötti kapcsolatok kialakításában, illetve a sejtadhézióban. A glikoziláció során egy oligoszacharid lánc (glikán) kovalens kötéssel kapcsolódik egy lipid vagy fehérje molekulához. Ennek eredményeként keletkeznek a glikolipidek vagy glikoproteinek, melyeket glikokonjugátumoknak neveznek. A glikoproteinek esetében egy fehérjelánc bizonyos aminosavjának oldalcsoportjához kapcsolódik az oligoszacharid. O-glikozilációnak hívjuk mikor szerin vagy treonin oldalláncához kapcsolódik az oligoszacharid. Az N-glikoziláció komplexebb folyamatnak nevezhető, mivel ebben az esetben egy aminosav szekvencia a feltétele a módosulás bekövetkeztének. A kapcsolódó lánc egy Asn-X (bármelyik aminosav a prolint kivéve)-Ser/Thr szekvenciájú fehérjelánc Asn oldalláncához kötődik. A glikoziláció szintézise nem-templát vezérelt, vagyis nincsen egy megadott „sablon folyamat/molekula amelyet követni kell, mint például a DNS replikáció, vagy a transzkripció esetében. A szintézist enzimek katalizálják, amelyek komplex lépésekkel járulnak hozzá ahhoz, hogy a szintézis során a folyamatosan épülő cukorláncok szerteágazó glikánokká alakuljanak a folyamat végére.

3.1.1. N-glikoziláció

Az N-glikoziláció a glikozil-transzferáz és glikozidáz enzimszoportok által végrehajtott reakciók sokaságának eredményeként megy végbe. Az N-glikánok szintézise az ER membránjában kezdődik, ahol egy dolikol-foszfátra kezdenek hozzákapcsolódni a különböző monoszacharidok molekulák (Man, GlcNAc, Glc). Ennek során egy oligoszacharid prekursor jön létre, amely két GlcNAc molekulából, kilenc Man egységből és három Glc cukoregységből áll. A szintetizálódott oligoszacharid molekula az ER membránjában kerül rá a fehérje Asn oldalláncára. Az ER lumenjében folytatódik az oligoszacharid lánc alakítása, valamint lejátszódik a fehérjék feltekeredése is. Amennyiben nem megfelelő a feltekeredés akkor az ER-ben lévő két chaperon fehérje, a calnexin és calretikulum nem engedi tovább lépni a kialakult

glikokonjugátumot. Miután megtörténik a glükóz molekulák glükozidáz I,-II enzimek általi eltávolítása a lánctól, a cukorlánccal ellátott fehérje a Golgi-apparátusba szállítódik, ahol további monoszacharid egységek leszakadásával jön először létre a N-glikánok mag stuktúrája, ami két molekula GlcNAc és három Man molekulából épül fel. Számos módon más cukrok kapcsolódnak, aminek végeredményeként jönnek létre az N-glikozilált fehérjék. A maghoz kapcsolódó monomerek lehetnek további mannóz (Man), N-acetil-glükózamin (GlcNAc) egységek, galaktóz (Gal), fukóz (Fuc) vagy szialinsav (Neu5Ac) szacharidok. A glikozilációban szerepet játszó glikán molekulák szerkezetileg magas heterogenitással jellemezhetőek, ugyanis az öttagú magszerkezethez sokféleképpen kapcsolódhatnak az egyes monoszacharid egységek, így stuktúrájukat tekintve három különböző típusú N-glikán határozható meg: magas mannóz tartalmú, komplex vagy hibrid szerkezetű N-glikánokat [7]. Magas mannóz tartalmú glikánról beszélünk, ha további 1-6 db mannóz egységek kapcsolódnak a mag szerkezethez. Hibrid típusú N-glikánok esetében a mannóz mellett szialinsav, galaktóz és N-acetil-glükózamin egységek is kapcsolódnak. A komplex típusú glikánok a magstuktúráján kívül nem tartalmazznak mannózt csak a N-acetil-glükózamin, galaktóz, szialinsav monomereket. A fukóz megjelenhet a magstuktúra első egységét jelentő N-acetil-glükózamin molekulán vagy a glikán lánc egyik cukormolekulájához kapcsolódva. A N-glikánok jellemzésének fontos tagja az antennaritás. A magstuktúrára felépülő további monomerek elágazásokat vagy az úgynevezett antennákat hoznak létre. Ezen antennák száma adja meg a glikán stuktúra antennaritását. Az antennák (A) számától függően megkülönböztethetünk monoantennás (1 darab), biantennás (2 darab), triantennás (3 darab), és tetraantennás (4 darab) N-glikánokat (1. ábra).



1. ábra: N-glikánok szerkezeti típusai és főbb jellemzői. Bio Render szoftverrel készítve.

3.2. Glikoproteinek és azok szerepe a gyulladásos betegségekben

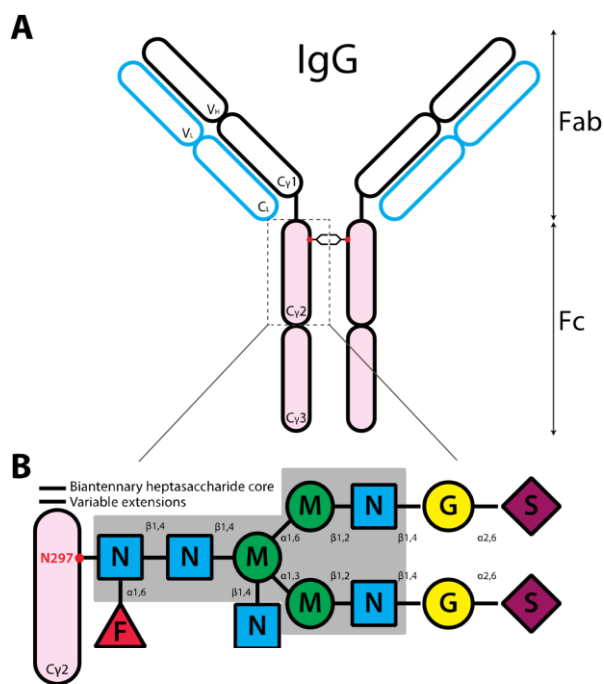
3.2.1. Glikoproteinek

A glikoproteinek egy fehérje gerincből, és a hozzá kapcsolódó oligoszacharid (glikán) láncból állnak. A kapcsolódás az aminosav oldalláncán keresztül történik. Két típust különböztethetünk meg. Az Asn-en keresztül kapcsolódó N-glikozidos, és a Ser/Thr oldalláncán kapcsolódó O-glikozidos kötést kialakító glikoproteint. A glikoproteineken elhelyezkedő glikán láncok sokféleségét jellemzi a makro-, és mikroheterogenitás. A makroheterogenitás az ugyanazon a fehérjegerincen lévő különböző glikozilációs helyeket adja meg, míg a mikroheterogenitás az egy kitüntetett glikozilációs helynél előforduló glikán struktúrák diverzitását [8]. A glikozilációs helyek számának függvényében a glikoproteinek szénhidrát tartalma 5-85% közötti lehet. A glikoproteinek a legtöbb élőlényben megtalálható. Az emberben is számos helyen előfordulnak A humán plazmában lévő fehérjék többsége

glikoprotein (az albumin kivételével), de megtalálhatóak még az extracelluláris mátrix-ban, vagy sejtek felszínén is.

3.2.2. IgG glikozilációja

Az immunglobulin G az ellenanyagok csoportjába tartozó fehérje molekula. Fontos szerepük van a humorális immunválaszban, amely során megkötik, és semlegesítik a különböző kórokozókat [9]. Az IgG-k teszik ki a plazmafehérjék 10-20%-át [10]. Felépítésüket tekintve Y alakúak, amelyet két nehézlánc és két könnyűlánc alkot. Funkcióját tekintve 2 részre osztható, a variábilis (Fab), és konstans (Fc), régiókra. Az Fab-régióknak fontos szerepe van az antigének felismerésében és megkötésében, míg az Fc a hozzá kapcsolódó Fc-receptorokkal részt vesznek többek között az antitest-dependens sejt-közvetített citotoxicitás (ADCC) folyamatban, amely célsejtek (elsősorban kórokozók) elpusztítását végzi [11]. Az IgG-k nehézláncjai tartalmazzak egy variábilis (V_H), régiót és három úgynevezett domént ($C\gamma_1$, $C\gamma_2$, $C\gamma_3$) a konstans régióban. A $C\gamma_1$ és $C\gamma_2$ közötti térben található a Hinge-régió. A $C\gamma_2$ doménben beágyazva található a legfontosabb és legismertebb N-glikozilációs hely, amely a 297-es aszparagin aminosavnál található (N297). Az aminosavról elágazó N-glikánok a két párhuzamos nehézlánc közötti térben helyezkednek el. A kapcsolódó monomerek számától, és az antennaritástól függően magas diverzitás alakul ki, amely során 30-nál is több kombináció alakulhat ki, amelyhez hozzájárul az is, hogy mindkét $C\gamma_2$ régióhoz kapcsolódik egy-egy glikán struktúra, amik egymástól különböző struktúrák lehetnek [12]. Az emberi IgG N297-en elhelyezkedő glikánjainak több mint 90%-a fukozilált, továbbá egyből kilenc glikán biszektilált, minden második galaktozilált, míg tízből egy szializált [13]. Az IgG glikozilációja számos esetben változást mutat. A különböző gyulladásos betegségek (lásd 3.3. pont) mellett megfigyeltek több olyan tényezőt is amely során változás történt a IgG N-glikozilációs mintázatában. A kor előrehaladtával megfigyelhető a galaktozilált és szializált glikán struktúrák növekedése [14]. A magas testtömeg-index (BMI) hatására megnő az agalaktozilált struktúrák szintje, míg a két galaktózt tartalmazó glikánstruktúrák szintje csökken [15].



2. ábra: Az IgG felépítése (A) és a N-glikoziláció fő helye (B) [12]

3.3. N-glikoziláció szerepe a gyulladásoos betegségekben

Számos kutatás alátámasztja, hogy egyes betegségekben megváltozik a fehérjék N-glikozilációja. Ezen betegségek nagy többsége gyulladásoos betegségek, amikor is az immunrendszer gyulladásoos válasza túlzottá válik. A rákos megbetegedések számos típusában megfigyelték a N-glikoziláció változását, mint például tüdőrák [16], mellrák [17], vagy hasnyálmirigyrák [18]. Vreeker és társai 86 hasnyálmirigyrákban szenvedő és 84 egészséges személy bevonásával vizsgálták a teljes szérum N-glikozilációjának a változását. A betegeknel erőteljesen megnőtt a tri-antennás glikánok mennyisége, ezzel együtt a két-antennás glikánok mennyisége csökkent, az antenna fukozilációja pedig nőtt [18]. Egyes autoimmun betegségekben is megfigyelhető glikán profilváltozás következik be. Ilyenek a gyulladásoos betegségek, mint például Crohn-betegség, (CD) a colitis ulcerosa (UC), vagy a sclerosis multiplex. Šimurina és társai több ezer mintának a vizsgálatával CD és UC betegségben szenvedő, valamint egészséges emberek plazmájának az IgG glikánprofilját vizsgálták meg, amelyben mindkét betegség esetén megfigyelhető volt az agalaktozilált glikánok mennyiségének növekedése. A CD betegeknel a mag fukozilációja növekedett, amíg az UC betegek esetében csökkenést figyeltek meg az egészséges kontroll csoporthoz képest [19]. Az anyagcsere rendszerben bekövetkező krónikus rendellenességnek köszönhetően alakul ki a 2-es típusú cukorbetegség. Lemmers és társai megvizsgálták a 2-es típusú cukorbetegségben

szenvedő és kontroll csoportok glikozilációs mintázatát, amely során az összes kétantennás fukozilált struktúrák szializációja csökkent, továbbá az egy galaktózt tartalmazó szerkezetekben is csökkenést figyeltek meg [20]. A visceral leishmaniasis (VL) vagy „fekete láz” egy parazita által okozott fertőző betegség. Porcino és társai által végzett kísérlet során emelkedett fukoziláció mellett a tetra-antennás szialsavak magasabb szintjét figyelték meg [21].

3.4. Analitikai vizsgálatok a glikomika területén

A glikomikában fontos terület a különböző glikopeptidek, és glikoproteinek analitikai vizsgálata, melyek segítenek feltárni a glikozilációs helyeket vagyis hova vannak kapcsolódva a fehérjén vagy peptiden a különböző cukorláncok. Fontos információt kapunk a glikozilációs mintázatból és ennek változásából, amely segíthet egyes betegségek diagnosztizálásában, megelőzésében. Ezek vizsgálatára még nincsen egy egységes elemzési módszer, mivel több tényező is szerepet játszik a megfelelő analízis kiválasztásában. Attól függően, hogy mit vizsgálunk, és hogy abból milyen információt szeretnénk kapni más-más analitikai módszer használata szükséges. A glikoproteinek elemzésére „lectin array” módszert használnak [22], míg a glikoforma profilozására MS-el kapcsolt folyadékkromatográfia (LC-MS) használata bizonyult a leghasznosabbnak [23]. A proteolízis során glikoproteinekből a fehérjelánc bomlása következtében keletkező glikopeptidek glikozilációs helyeinek elemzésére elterjedt a MALDI TOF-MS módszer [24]. A glikopeptidekről leemésztett glikánok analitikájára többfajta elemzés használatos, mivel az egyes módszerekhez a detektálhatóság érdekében meg kell jelölni a cukorláncokat. A jelöletlen glikánok részletes szerkezeti elemzésére a Nano-LC-MS/MS használatos. A glikánok jelölése legtöbb esetben valamilyen fluoreszcens jelölővel történik, mint például a 2-AA, 2-AB, APTS [25], vagy prokainamid [26], amely lehetővé teszi azok fluoreszcens detektálhatóságát. Ezeknek a jellemzésére hidrophil kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfiát (HILIC) használnak, amelyet a jelölt glikánok detektálására FLR-vel kötnek össze. A HILIC hatékonyan elválasztja a különböző glikán fragmentumokat, ami után a jelölő molekula a kibocsátott fluoreszcens fényét az FLR detektálja, így kapva akár a teljes glikán profilt.

3.4.1. Folyadékkromatográfia

Napjainkban a legnagyobb mennyiségben használt elválasztási módszer a nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC) [27]. Az elválasztás alapja a mozgófázis és az állófázis közötti kölcsönhatás. A mozgófázis (amely folyadék) egy töltettel rendelkező oszlopon halad át. A mozgófázis komponensei kölcsönhatásba lépnek az állófázis szemcséivel, amik különböző

kölcsönhatások révén visszatartja a komponenseket. A normál-fázisú HPLC esetén a mozgófázis apoláros, míg az állófázis valamilyen poláros (általában szilikagél) anyag. Az elválasztás során először a legkevésbé poláris anyag eluálódik az oszlopról, mivel ez a komponens alkotja a legkisebb kölcsönhatást az oszlopon lévő erősen poláris fázissal. Fordított fázisú HPLC esetén ennek az ellentétje történik, ahol a mozgófázis poláris és a állófázis valamilyen apoláris töltet (C8, C18, fenil). Lehetőség van arra, hogy a mérés alatt az eluens összetételét változtassuk. Ezt hívják gradiens elúciónak. Az elúció általában víz és egy valamilyen apoláris oldószer. Az összetételt változtatva gyorsabban eluálódnak a komponensek, így rövidebb futási időt érhető el. Az elválasztás során az eluens tartályokban lévő mozgófázisokat egy nagynyomású pumpa áramoltatja, ami biztosítja az állandó sebességen és nyomáson való áramlást az oszlopon keresztül. Egyes berendezések rendelkeznek oldószerkeverővel, ami segíti a megfelelő arányú eluens arányt kikeverni. Szintén előforduló egység a gázmentesítő, ami az esetleges légbuborékokot távolítja el a rendszerből. A légbuborékok megzavarhatják a mérést, mivel a pumpában nyomásváltozás ingadozásokat okozhat, valamint az oszlopra jutva megzavarhatják az áramlást, továbbá a detektor érzékenységét is befolyásolhatják. Az injektor beadagolja a rendszerbe a mintát, ami a modern készülékeke esetében már automatikusan történik. Végbemegy ezután az oszlopon való elválasztás, majd a detektor méri a kijövő jeleket. Attól függően, hogy a minta komponensének milyen tulajdonsága alapján történik a detektálás, többféle detektor különböztethető meg. Leggyakoribb detektorok közé tartozik a UV-VIS, aminek feltétele, hogy a mért komponens rendelkezzen kromofor csoporttal, hogy a detektor érzékelhesse a hullámhosszokat. A FLR detektor a minta fluoreszcens tulajdonságain alapulva méri a kibocsátott fényt. A detektor által mért intenzitások az adatfeldolgozó egységbe kerülnek, ahol a kapott kromatogramok szoftverekkel való kiértékelése történik meg.

3.4.1.1. Ultranagy-nyomású folyadékkromatográfia (UPLC)

Az UPLC szintén vegyületek elválasztására, azonosítására, és mennyiségi meghatározására alkalmas módszer. A HPLC továbbfejlesztett változata, amely az alapvető felépítését tekintve hasonló. Az UPLC a HPLC-nél lényegesen nagyobb, 1000 bar nyomáson működik, így csökken az elválasztás ideje, illetve a felhasznált oldószer mennyisége is, mivel kisebb oszlopok használata elérhető. Ez fontos mert így lerövidülhetnek a mérési idők, így több minta elválasztása történhet meg ugyanazon idő alatt. A mérések idejének rövidülése a leginkább a gyógyszeriparban fejtette ki a hatásását, ahol sok a napi szinten elvégzendő rutin hatóanyagvizsgálatok, és tisztaságvizsgálatok száma [28]. A magas nyomásnak köszönhetően

az oszlopokban kisebb átmérőjű tölteteket használhatóak ($<2\mu\text{m}$), ezáltal keskenyebb, és magasabb csúcsokat elérve. Emellett sokkal jobb érzékenységet nyújt mint a HPLC, ami az alacsony koncentrációjú minták elemzésére válik hasznossá.

3.4.2. Tömegspektrometria (MS)

Az MS olyan analitikai módszer, amellyel meghatározható többek között vegyületek mennyisége, a molekulatömeg, molekulák szerkezete, és az izotóparány is. Felépítését tekintve tartalmaz: Ionizátort, analizátort, detektort, és az adatgyűjtő rendszert. A bejuttatott mintát először gőz formába hozzák, majd ionizálják, vagyis töltéssel látják el. Az így keletkező ionokat az analizátor töltés/tömeg (m/z) szerint választja el egymástól. Ennek eredményeként tömegspektrumokat kaphatunk. Az MS használata a glikán analízisben mára már szinte elengedhetetlen, mivel pontos és érzékeny információt nyújt többek között a glikánok szerkezetéről, és tömegéről. A glikánok gyenge ionizációs hatékonysággal rendelkeznek, ezért szükség van egy olyan jelölő molekulára, amivel javítják az MS-ben történő detektálhatóságot. A leggyakrabban használt módszerek közé tartozik a permetilezés [29], vagy valamilyen fluoreszcens csoporttal való jelölés [30]. Az MS mérés egyik legfontosabb lépése a minták ionizálása. a MALDI és elektropray ionizáció (ESI) a két fő használt módszer az ionizációhoz glikán analízishez. A MALDI repülési idő analizátort (TOF) használva kiváló többek között a neutrális glikánok elemzésére [31]. Az ESI folyadékkromatográfiával kapcsolva szintén jó N-glikán mintázat analízist tesz lehetővé [32].

4. Anyagok

4.1. Vegyszerek

- PNGase F enzim kit: 10x denaturáló puffer, 10x Gliko puffer (New England Biolabs, Ipswich, MA, US)
- Borán-2-metilpiridin komplex, prokainamid-hidroklorid, DMSO, Ecetsav, Hangyasav, Acetonitril, 20 % Ammónium-oldat, Ammónium-acetát, 30%-os Akrilamid, 10%-os AMPER, TEMED, 20x PBS, Metanol, Etanol, Glicin-HCl, 2-merkaptó-etanol, glicerol, SDS, TRIS (VWR International Kft., Radnor, PA, US)
- PNGase F enzim (Asparia Glycomics, San Sebastián, Spain)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 festék (PanReac AppliChem, Barcelona, Spain)
- ProSieve™ QuadColor™ protein marker (Lonza, Basel, CH)
- PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Rituximab 100 mg/10 ml (Roche, Basel, CH)

4.2. Szérum minták

38 db kontroll és 40 db vakbélgyulladásal diagnosztizált gyermektől vett szérumminta gyűjtésére került sor a Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Központi Kórház és Egyetemi Oktatókórház együttműködésével. A kontroll csoport tagjainak átlagéletkora 10 év, míg a vakbélgyulladásal diagnosztizáltak gyerekeké 11 év. A kontroll csoport mintái között a nemek aránya az alábbiak szerint oszlottak meg: 26 fiú és 12 lány. A beteg csoport mintái között 31 fiú illetve 9 lány minta került vizsgálatra.

5. Módszerek

5.1. IgG kisedése szérumból Protein G oszloppal

A Protein G High Performance Spintrap (Cytiva, UK) oszlop egy affinitáson alapuló centrifugális oszlop, amelyet IgG antitestek tisztítására használnak. Az oszlop egy agaróz szilárd hordozóra kötött Protein G fehérjét tartalmaz. A Protein G egy olyan fehérje, amely képes az IgG Fc régiójával ionos és hidrofób kötést kialakítani, ezáltal elkülöníthető az IgG molekula a szérumból többi fehérjétől. A centrifugálás során a szilárd hordozón lévő Protein G-hez kötött immunglobulinok a centrifugális erő hatására különülnek el, és az oszlopról leöblíthetők. Az így nyert tiszta IgG koncentrátum később további elemzésekhez, alkalmazásokhoz vagy klinikai felhasználásra is felhasználható.

Munkám során szérumból izoláltam IgG fehérjét. Az oszlopra felvitt szérumból IgG fehérje reverzibilisen kötődik az oszlopon, amit egy egyszeri mosás után alacsony pH értékű pufferrel lehet megszüntetni. Az így kinyert IgG mintához adtam semlegesítés céljából egy magasabb pH tartalmú puffert, azért, hogy stabilizálja a fehérjét, és elkerülje a denaturációt. Az IgG izolálásához az 1. táblázatban feltüntetett összetételű puffereket használtam.

1. táblázat: IgG izolálásához használt pufferek

Puffer neve	Összetétel [alkalmazott térfogat]	Végkoncentráció [végtérfogat]
Kötő puffer	1x PBS [300 µl]	0,75x PBS [400 µl]
Mosó puffer	1x PBS [400 µl]	1x PBS [400 µl]
Elúciós puffer	0,1 M Glicin-HCl (pH 2,7) [400 µl]	0,09 M Glicin-HCl (pH 2,7) [430 µl]
Neutralizáló puffer	1 M TRIS (pH 8,5) [30 µl]	0,07 M TRIS (pH 8,5) [430 µl]

Az IgG izolálást, a gyártói utasításokat követve, az alábbi lépések szerint végeztem el:

1. Protein G centrifuga oszlopot egy 2 ml-es Eppendorf csőbe tettem, és 1000 g-n, 30 mp-ig centrifugáltam. Az Eppendorf-cső alján összegyűlt átfolyóra nem volt szükségem ezért eltávolítottam.
2. A gyantára mértem 400 µl 1x PBS puffert, amivel átmostam az oszlopot és ezáltal egyensúlyba hoztam, még a szérumból minta felvitele előtt. Ismét 30 mp-ig 1000 g-n centrifugáltam, az átfolyót eltávolítottam.
3. Ezután 300 µl 1x PBS puffert, valamint 100 µl szérumból mintát mértem a gyantára. Óvatosan összevortexeltem a csövet. Szobahőmérsékleten, 5 percig inkubáltam, majd

- 1000 g-n 30mp-ig centrifugáltam. Az átfolyót eltettem és feliratoztam. Ez lesz a binding frakció.
4. További 400 µl 1x PBS-t mértem a gyantára, majd 1000 g-n 30 mp-ig centrifugáltam. Az átfolyót kiöntöttem.
 5. Az oszlopot új Eppendorf-csőbe helyeztem, majd 400 µl 0,1 M Glicin-HCl (pH 2,7) oldatot mértem rá, illetve 30 µl 1M TRIS (pH 8,5) puffert pipettáztam az új Eppendorf-csőbe, még a centrifugálást megelőzően azért, hogy a savas közegben lévő IgG-t semlegesítsem.
 6. Vortexeltem a mintákat, utána 1000 g-n 30mp-ig centrifugába tettem. Az átfolyót feliratoztam, ez volt az elúciós frakció.

5.2. Protein G oszlop regenerálása

Az IgG minták kiszedéséhez egy Protein G oszlopot többször használtam fel. Az oszlopon az eluálást követően IgG és más fehérje maradványok maradhatnak vissza, ami befolyásolhatja a következő IgG minta tisztaságát és koncentrációját. Ennek az elkerülése van szükség az oszlop regenerálása, amelyet a következő protokollal végeztem:

1. A Protein G oszlopot 2 ml-es Eppendorf-csőbe helyeztem. Ebben gyűjtöttem az átfolyókat.
2. Az oszlopra mértem 400 µl Glicin-HCl-t majd 1000 g-n centrifugáltam 30 mp-ig. Ezt a lépést még egyszer megismételtem.
3. Mértem az oszlopra 400 µl 1x PBS-t majd szintén 1000 g-n centrifugáltam 30 mp-ig. Megismétlem ezt a lépést is.
4. Az átfolyókat tartalmazó Eppendorf-csövet eltávolítottam. Majd az oszlop aljára visszacsavartam az alját.
5. Az oszlopra mértem 400 µl 20%-os etanolt, amely megvédi az oszlop felületét a szennyeződésektől a következő használatig.

A vakbélgyulladásra irányuló kísérletsorozat előtt elvégeztem egy előkísérletet, ahol a gyártói utasítás szerint megadott elúciós pufferrel dolgoztam. Ennek során 0,1 M Glicin-HCl-t alkalmaztam. A kísérlet során 2 szérummintából izoláltam IgG-t, majd lemértem azok koncentrációját NanoDrop berendezésen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

5.3. Glicin-HCl-ben lévő IgG minta puffercseréje

A TRIS:Glicin-HCl, 1:13 arányú oldatába eluált IgG fehérjék puffercseréjét végeztem el, mivel a fehérjék stabilitása neutrálisabb pufferben jelentősen javul. Emellett a foszfát-sókat tartalmazó közeg előnye, hogy az enzimatikus emésztéshez (további felhasználás) optimális környezetet biztosít, mivel a foszfátok megfelelő pH-t és ionos környezetet teremtenek az enzimek aktivitásának fenntartásához, ezáltal javítva a reakció hatékonyságát és megbízhatóságát. A puffer cseréjéhez 10 kDa-os Amicon Ultra (Merck, Bray, IRL) centrifuga csövet alkalmaztam. A két részből álló cső felső részében található egy olyan szűrőmembrán, amely pórusain keresztül a 10 kDa-nál kisebb molekulák átjutnak, míg a nagyobbak nem. Jelen esetben a puffer molekulatömege alacsonyabb a szűrőmembrán pórusainál (0,11 kDa és 0,12 kDa), míg a 150 kDa molekulatömegű IgG fennmarad a membránon.

A puffercseréhez 1x PBS puffert készítettem. A puffercserét az alábbi lépéseket követve végeztem el:

1. A 400 µl 0,1 M Glicin-HCl (pH 2,7) oldatba eluált IgG mintát átmértem a 10 kDa-s szűrőfelülettel ellátott centrifugacsőbe, majd 12.000x g-n, 4°C-on 20 percig centrifugáltam. Az átfolyót eltávolítottam.
2. A szűrős centrifugacsőre mértem 400-400 µl 1x PBS-t, majd 12.000x g-n, 4°C-on 20 percig centrifugáltam. Az átfolyót eltávolítottam.
3. Ezt követően további 200-200 µl 1x PBS-t mértem a szűrős centrifugacsőre, majd 12.000x g-n, 4°C-on addig centrifugáltam, amíg a minta 50 µl térfogatra be nem töményedett.
4. Ezt követően a szűrőfelületről leszívtam az IgG-t tartalmazó 1x PBS mintát és egy tiszta Eppendorf-csőbe mértem át.

5.4. Fehérje minták koncentrációjának meghatározása

A fehérjék koncentrációjának meghatározása számos esetben szükséges, és elengedhetetlen a pontos és robusztus vizsgálatok elvégzésében. Az UV abszorbancia mérés a legáltalánosabb koncentráció meghatározására, amely az aromás aminosavak 280 nm-en elnyelő hullámhosszait használja [33]. A humán szérumban található összfehérje koncentrációjának meghatározása kulcsfontosságú lehet, mivel az összfehérje szintjének csökkenése különböző betegségekkel állhat összefüggésben. Erre használt módszer a Biuret-teszt, amely során a fehérjékben található peptid kötések a reagensben található réz (II)-ion lila komplexet

képeznek, amely 540 nm-en mérhető spektrofotometriával [33]. Színreakción alapuló fehérjekoncentráció meghatározás a Lowry,- és Bradford-fehérjeteszt.

5.4.1. Minták koncentrációjának mérése NanoDrop berendezéssel

A NanoDrop berendezés (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) egy olyan spektrofotométer, amely alacsony, 1-2 µl térfogatú mintából képes meghatározni fehérjék, és nukleinsavak koncentrációját és tisztaságát. A mért abszorbancia ismeretében és a Lambert-Beer törvényt alkalmazva határozható meg egy mintának a koncentrációja. Az A280 módszer a tisztított fehérjék koncentrációjának meghatározására szolgál. A készülék 280nm-en méri meg a mintát, mivel az aromás aminosavak (pl: triptofán, tirozil) ezen a hullámhosszon nyelik el a fényt. Mivel a mérés alapjául a Lambert-Beer törvény szolgál ezért nincs szükség kalibrációs egyenes felvételére, csak egy „Vak” oldat mérésére, ami a fehérjénket tartalmazó oldat lesz. A készülék a fehérje moláris extinkciós együttható ismeretében (ϵ) határozza meg a fehérje koncentrációt a következőképpen:

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot b}$$

ahol, A= Minta mért abszorbanciája 280 nm-en [-]

ϵ = Moláris extinkciós koefficiens [$L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$]

b= Fényút hossza [cm]

A méréseimben vak oldatnak 1x PBS-t használtam. A méréseket háromszor végeztem el, majd ebből egy átlagolt koncentrációt és szórást számoltam.

5.4.2. Minták koncentrációjának mérése Bradford-reagenssel

A koncentráció méréshez CLARIOstar Plus (BMG LabTech, Germany) mikrolemez olvasó készüléket használtam. Ez a készülék a fehérje minta abszorbanciáját 595 nm hullámhosszon, méri meg úgy, hogy egy 96 lyukú UV-Star (Greiner BioOne, AT) mikrolemezbe mértem a szükséges mennyiségű Bradford-reagenst és fehérje mintát. Annak érdekében, hogy az esetleges háttérszennyezők jelenlétével korigáljon a szoftver, mérést készít 465 nm hullámhosszon is. Ezek a nem fehérje eredetű szennyezők származhatnak az alkalmazott pufferből vagy a mintából is. A koncentráció meghatározáshoz kalibrációs sort készítettem, melyhez 10 µg/µl koncentrációjú Rituximab törzsoldatból indultam ki. A kalibrációs sor tagjai 8; 6; 4; 2; 1; 0,5 µg/µl koncentrációjú minták voltak, melyeket 1x PBS-ben hígítottam. Vak oldatnak szintén 1x PBS oldatot alkalmaztam.

A reakció összeállítását a következő lépéseket követve végeztem el:

1. A microplate-be mértem egységesen 200-200 μ l Bradford-reagenst (100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 + 50 ml 95% etanol + 100 ml 85% foszforsav + 850 ml dH_2O)
2. A reagensekhez mértem a kalibrációs sor tagjaiból és a mintáimból 10-10 μ l-t
3. A pipettával jól összeszuszpendáltam, ügyelve arra, hogy homogén színeket kapjak
4. 10 perc szobahőmérsékleten történő inkubálás után megmértem a minták abszorbanciáját.

Az 595 nm és 465 nm-en mért abszorbanciák különbségéből meghatároztam a tényleges abszorbancia értékeket. Ezután felvettem a hígítási sorhoz a kalibrációs egyenest, ami az IgG koncentráció meghatározásában az ismert koncentrációjú standard oldatok mérési eredményein alapul. Az eljárás során a standard oldatok különböző hígításaiból meghatározzuk az abszorbanciát 595 nm és 465 nm hullámhosszon. Az abszorbancia-különbség (595 nm - 465 nm) alkalmazásának célja az interferencia minimalizálása, mivel a 340 nm-es méréssel kompenzálható a háttérzaj vagy a nem specifikus abszorbancia, amely független a fehérjétől. A mérési eredmények alapján kalibrációs görbét készítünk, amely az abszorbancia értékeket (y tengely) ábrázolja a standard oldatok ismert koncentrációival (x tengely) szemben. Az adatokra lineáris regressziót alkalmazva kalibrációs egyenest kapunk, amely általános alakja:

$$y=m \times x+b, \text{ ahol:}$$

- y az abszorbancia-különbség,
- m az egyenes meredeksége, amely a koncentráció és abszorbancia kapcsolatát fejezi ki (az érzékenységet mutatja),
- x a standard koncentráció,
- b a tengelymetszet, amely az esetleges eltolódást jelzi (ideális esetben nulla vagy a háttérzaj hatása).

A kapott egyenlet segítségével a minták abszorbancia értékeiből visszszámolható a koncentráció, mivel a mért abszorbancia a minta IgG koncentrációjával arányos. A kalibrációs egyenes így lehetővé teszi az ismeretlen minták IgG tartalmának pontos kvantifikálását, feltéve, hogy a minta koncentrációi a kalibrációs görbe lineáris tartományába esnek.

5.5. SDS-PAGE

Az SDS-PAGE (nátrium-dodecil-szulfát–poliakrilamid gélelektroforézis) a fehérjék elválasztására, a fehérjék mennyiségi meghatározására, kvalitatív elemzésére alkalmazott módszer. A fehérjék, a hő és az SDS hatására denaturálódnak, egységes negatív töltést kapnak.

Az SDS egy anionos detergens, amely a fehérjékhez kötődve felbontja a háromdimenziós szerkezetét. Az SDS hidrofób része beépül a fehérje hidrofób magjába így alakítva negatív töltésűvé. A polimerizálódott porózus hatású akrilamidban a fehérjék méretük alapján haladnak (kisebb méretű fehérjék gyorsabban, nagyobb méretűek lassabban), így molekulatömeg szerinti fehérje elválasztást tesz lehetővé ez a módszer. AZ SDS-PAGE két különböző koncentrációjú gél együttes alkalmazásával valósul meg. Ez azt jelenti, hogy a vertikálisan elhelyezkedő gél két részből áll: egy alsó vagy másnéven szeparáló gélből és egy felső, gyűjtő gélből. A gyűjtő gél kisebb koncentrációjú, ami azt eredményezi, hogy a pórusok nagyobbak lesznek így a nagyobb méretű fehérjék is könnyebben vándorolhatnak alacsony feszültség mellett. Ez a gél arra szolgál, hogy az egységes töltéssel ellátott, de különböző méretű fehérjék egy sorba rendeződjenek és egyszerre lépjenek be az alsó gélbe, ahol megkezdődik a valós molekulatömeg szerinti szeparáció. Az általam alkalmazott gyűjtő gél 5%-os gél volt, míg szeparáló gélnek 8% gélt alkalmaztam. A gélöntéshez és módszer kivitelezéséhez BioRad Mini-PROTEAN gélöntő és gélfuttató rendszert alkalmaztam (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA). Az alkalmazott SDS-PAGE módszer három lépésből áll, melyeket az alábbi pontok tartalmaznak:

2. táblázat: SDS-PAGE módszerhez használt pufferek összetétele az adott reagens végkoncentrációjával feltüntetve

Oldat neve	Összetétel		
Alsó gél puffer	1 M TRIS	0,4% SDS	
Felső gél puffer	1,5 M TRIS	0,4% SDS	
Mosóoldat (1 l)	12 % Etanol	7 % Ecetsav	
Festék (250 ml)	0,25 g Coomassie Blue Brilliant	200 ml 50% Metanol	50 ml Jégecet
10x SDS puffer (1000 ml)	250 mM TRIS	1,9 M Glicin	0,034 M SDS

5.5.1. Gélöntés

8%-os szeparáló gél összetétel:

- 2,66 ml 30%-os akrilamid oldat
- 4,7 ml desztillált víz
- 2,65 ml alsó gél puffer (1,5 M TRIS; 0,4% SDS, pH 8,8)
- 100 µl AMPER

- 10 µl TEMED

5%-os gyűjtő gél összetétel:

- 600 µl 30%-os akrilamid oldat
- 1800 µl desztillált víz
- 800 µl felső gél puffer (1M TRIS; 0,4% SDS; pH 6,8)
- 32 µl AMPER
- 28 µl TEMED

A gélöntéshez először összeállítottam a futáshoz szükséges mintatartót. A két üveglapot egymással szembe állítottam úgy, hogy a lapok között legyen egy hézag a gélek feltöltésére. Az egymással szembe fordított üveglapokat egy speciális műanyag kapuba tettem, amíg megöntöttem a gélt. Feltöltöttem 8%-os szeparáló géllal, majd vízzel lezártam a gél tetejét, hogy oxigén mentes közeget biztosítsak neki, így gyorsabbé téve a polimerizációt. 15 perc elteltével leöntöttem a vizet, majd elkészítettem a gyűjtő gélt. Megöntöttem a gélt, majd vártam további 10 percet. Miután megdermedt, a futató kádba tettem a géleket. A futató kádat jelig felöntöttem 10x SDS pufferből 1x-re hígított SDS-pufferrel.

5.5.2. Mintafelvétel

Mivel a géltre egységesen 10 µg fehérjét kell felvinni, ezért minden minta estében más-más mennyiséget mértem be, amiket a mért koncentrációk alapján határoztam meg. Minta összetétele az alábbiak szerint alakult:

- Össztérfogat: 15 µl
- 2x Loading dye (0.125 M TRIS, 0.14 M SDS, 20% glicerin, 10% 2-merkaptóetanol)
- 10 µg fehérje
- desztillált víz: kiegészítve 15 µl-re

Használtam továbbá pozitív kontrollnak rituximab standard fehérjét. Mérés előtt a mintákat denaturálás céljából 65 °C-on inkubáltam 15 percig. Miután a megöntött géleket a futatókádba helyeztem, és felöntöttem a kádat a futató pufferrel, felvittem a mintákat. Az első zsebbe 4 µl fehérje markert vittem fel (1-es marker: ProSieve™ QuadColor™ protein marker, 4.6 kDa – 300 kDa (Lonza, Basel, CH) 2-es marker: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa(Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), majd a markert követte a rituximab, mint pozitív kontroll, ezt követően pedig a minták kerültek felvitelre. A tápegységen először beállítottam a feszültséget 100 V-ra 10 percig, majd mikor a minták a gyűjtő-és a szeparáló gél határához értek felvettem a feszültséget 200 V-ra és nagyjából 1 órán át futtatam.

5.5.3. Gélfestés és gélmosás

Miután a minta elérte az üveglap alját, a géleket festékbe tettem, majd Multi Bio 3D (BioSan, LV) típusú billegtetőn 30 percig inkubáltam. Ezt követően gélfesték mosóoldatot készítettem 1 liter végtérfogatban. Dobozba tettem a gélt, amire öntöttem a mosóoldatból. Billegtetőre tettem, majd 20 perc elteltével kicseréltem a mosóoldatot, ezt addig ismételtem, míg a gélből ki nem mosódott teljesen a festék. Az SDS a fehérjéhez irreverzibilisen kötődik, míg a festék reverzibilisen mivel az etanol/ecetsav mosóoldat hatására megszűnnek a kialakított kötésesei. Ezután kiértékeltem a kapott sávokat, a fehérje létrához hasonlítva.

5.6. N-glikán minta előkészítés folyamata

Az N-glikán mintaelőkészítés során kiemelten fontos, hogy az elemzés során kapott eredmények megbízhatóak legyenek. Első lépésként a glikánok enzimatisz felzabadítása történik amelyet PNGase F enzimmel végeztem [34]. Az emésztés során az enzim lehasítja az N-glikánokat a glikoproteinek fehérjeláncáról, így kapjuk meg a felzabadított N-glikánokat. A glikánok analízise FLR detektorral történik, és mivel a glikánok nem rendelkeznek fluorofór csoporttal ezért szükséges őket fluoreszcens molekulával megjelölni. Az emésztett és jelölt N-glikánokat tartalmazó oldatot meg kell tisztítani az olyan szennyezőktől, mint például a PNGase F enzim maradványai, és a használt pufferek sói. A tisztítás elengedhetetlen mivel ez biztosítja, hogy az N-glikánok UPLC-vel történő analízisét nem befolyásolják az esetleges szennyezők. Ehhez 0,5 mg/ml $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-oldatot használtam.

5.6.1. Enzimatisz glikán felzabadítás

1. 9 μl szérum vagy IgG mintához (szérum: MNP előtesztek, 7.1. pontban részletezve; IgG: klinikai mintaszettek elemzése 7.4. pontban részletezve) adtam 1 μl 10x denaturáló puffert. Vortexeltem, centrifugáltam pár másodpercig, majd 65 °C-on inkubáltam 15 percig.
2. A 15 perc elteltével a mintákat visszahűtöttem, pár percre a hűtőbe téve.
3. 10 μl mintához adtam 7 μl desztillált vizet, 2 μl 10x Gliko puffert, és végül 1 μl PNGaseF enzimet. Megint vortexeltem, centrifugáltam a csöveket, majd egész éjszakára 37 °C-ra inkubátorba tettem a mintát.

5.6.2. Fluoreszcens jelölés

1. A fluoreszcens jelölőt a következőképpen készítettem el egy 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe:
 - Bemértem 10 mg prokainamid-hidroklorid és 10 mg borán-2-metilpiridint. Ezt feloldottam 100 μl 70/30 arányú DMSO/ecetsavban.

2. Ezután 10-10 μl -t adtam a mintákhoz, majd 65 °C-on inkubáltam 3,5 órán keresztül a jelölt mintákat.
3. Az idő elteltével kivettem a mintákat (30 μl fluoreszcensen jelölt glikán minták) az inkubátorból, majd 170 μl 100%-os acetonitrilt adtam a mintákhoz, majd lecentrifugáltam.

5.6.3. Glikán tisztítás MNP-vel

1. Kikészítettem mintánként 2-2 1,5 ml Eppendorf-csövet. Egyik Eppendorf-cső az izoláláshoz lesz szükséges (MNP-oldatot mérek bele), másik Eppendorf-csőbe a megkötődés utáni „Binding” frakciót mértem.
2. Az egyik csőbe mértem 200 μl desztillált vízben diszpergált 0,5 mg/ml-es koncentrációjú $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-oldatot, amit 1 percig mágneses állványra tettem, majd eltávolítottam róla a vizet.
3. Az acetonitrilben oldott glikán minta felülúszóját az MNP-t tartalmazó Eppendorf csőbe mértem és összeszuszpendáltam vele. 5 percig inkubáltam szobahőmérsékleten, majd mágneses állványra helyeztem 1 percig.
4. Leszívtam a felülúszót, amit eltettem (ez lesz a Binding frakció), majd a MNP-hez adtam 200 μl 95%-os (NH_3 -formiátban oldott) acetonitrilt. Ismét állványra tettem 1 percig, majd leszívtam a felülúszót, amit kidobtam.
5. A MNP-hez adtam 100 μl 50 mM ammónium-formiátot (pH 4.4). 5 percig inkubáltam vele. 1 percre a mágneses állványra tettem az Eppendorf-csöveket, majd leszívtam a felülúszót, amit HPLC mintatartóba mértem át, ez az elúciós frakció.

5.7. Glikán analízis UPLC-MS módszerrel

Az eluált glikán minták Waters I-class ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfiai berendezéssel (UPLC) kerültek elválasztásra és fluoreszcens módon detektálásra, illetve Waters Xevo-G2-XS QToF tömegspektrométerrel azonosításra (Waters, Milford, MA, USA). A cukormolekulák HILIC módszerrel, Waters Glycan BEH Amide, 100×2.1 mm i.d., $1.7 \mu\text{m}$ töltetű oszlopot (Waters, Milford, MA, USA) alkalmazva lettek lemérve. Az UPLC és MS módszerek további paramétereit a 3.táblázat tartalmazza. A fluoreszcens kromatogramok integrálása és a tömegspektrumokról történő glikánok m/z érték alapján történő azonosítása Unifi szoftverrel történt.

3. táblázat: UPLC méréshez tartozó paraméterek

UPLC paraméterek	
Oszlop típus	Waters Glycan BEH Amide 5, 4.6(100 x 2.1 mm belső átmérő (i.d.), 1.7 µm részecskeméret)
A puffer	50 mM, pH 4.4 ammónium-formiát oldat
B puffer	Acetonitril
Áramlási sebesség	0.4 mL/min
Gradiens	72-55%
Erős mosó puffer / Gyenge mosó puffer	20% AcN / 80% AcN
Injektálási mód	PL
Injektálási térfogat	5 µL
Oszlop hőmérséklet	60°C
Exitációs / emissziós hullámhossz	$\lambda_{ex} = 309 \text{ nm} / \lambda_{em} = 359 \text{ nm}$
MS paraméterek	
Ionizációs mód	pozitív
m/z tartomány	500-2000 m/z
Elektrospray feszültség	2.2 kV
Deszolvatációs hőmérséklet	120°C
Gázáram	800 L/óra

5.8. Kiértékelő szoftverek, statisztikai tesztek

5.8.1. Mann-Whitney kétmintás U-próba

A Mann–Whitney kétmintás U-próba egy nemparaméteres statisztikai teszt, amely független minták mediánjának összehasonlítására szolgál. A próba célja annak meghatározása, hogy van-e statisztikailag szignifikáns eltérés a két minta mediánja között, vagyis a megfigyelt különbség valószínűsíthetően nem a véletlen hatásának tulajdonítható. A próba első lépésében a minták elemeit egyesített módon rangsoroljuk növekvő sorrendben, az egyes elemekhez 1-től az összesített elemszámig terjedő rangokat rendelve. Ezt követően meghatározzuk a két csoport rangösszegét, majd ezekből kiszámítjuk az U-értéket a megfelelő képlettel. A kapott két U-érték közül a kisebbet tekintjük a tényleges U-értéknek. Az eredmény értékeléséhez a választott

szignifikanciaszinthez és mintaszámokhoz tartozó kritikus értéket egy statisztikai táblázatból keressük ki. Ha a számított U-érték kisebb, mint a kritikus érték ($U_i < U_{krit}$), a nullhipotézist elutasítjuk. Ez azt jelenti, hogy a minták között statisztikailag szignifikáns különbség van. Az U-érték meghatározásához használt képlet az alábbi:

$$U_x = R_x - \frac{A_x \times (A_x + 1)}{1}$$

ahol, R: A minta rangjainak az összege

A: Minta elemszáma

5.8.2. Heatmap analízis

A hőtérkép alapú analízis lényege hogy, szignifikanciát keressünk két mintacsoport tulajdonságai között. Az egyes változópárokhoz meghatározzuk a korrelációs együtthatót, tehát hogy mennyire függenek egymástól. Ezt elvégezzük mindkét csoport összes változópárjaihoz, majd az azonos változópárokhoz tartozó korrelációs együtthatóit kivonjuk egymásból így tudjuk azonosítani, hogy vannak-e olyan változópárok amelyek az egyik vagy másik mintacsoportban jobban összefüggenek egymással. A kapott eredményeket egy adatmátrixban ábrázoljuk ahol -1 és +1 közötti korrelációs együttható értékek mutatják a csoportok együtt függésének a mértékét.

5.8.3. PCA analízis

A főkomponens analízis (PCA) egy statisztikai módszer, amely nagy adathalmazok több változóinak számát úgy redukálják, hogy az adatok varianciájának jelentős többségét megőrizve csökkentett dimenzióban vizuálisan ábrázoljuk. Az analízis során az eredeti változókat lineáris kombinációkkal főkomponensekre bontják, amelyek az adathalmaz legnagyobb varianciáját követik. Az első főkomponens lesz az irány amerre a legnagyobb a variancia (PC1). Az erre merőleges főkomponens a fennmaradó varianciának a lehetséges legnagyobb értéke (PC2). Az PCA elemzés első lépéseként az összes változó átlagát kivonjuk a hozzájuk tartozó adatpontokból, így az adatok központosítva lesznek. Ezután a központosított adatok alapján kiszámoljuk a kovariancia mátrixot, amely az egyes jellemzők közötti kapcsolatokat jellemzi. Kiszámítjuk a kovariancia mátrix saját vektorait és sajátértékei. Majd végezetül kiválasszuk a főkomponenseket, és az adatokat erre a kétdimenziós koordináta-rendszerre transzformáljuk.

5.8.4. Boxplot ábrázolás

A Boxplot, vagy dobozdiagram egy olyan statisztikai ábrázolási módszer, amely egy adott adatsor eloszlásának a jellemzésére szolgál. A dobozdiagrammal ábrázolással gyorsan információt kaphatunk a az adathalmaz tendenciájáról, mediánjáról, illetve az esetleg megjelenő kiugró értékekre is. A doboznak a 2 határát az alsó és felső kvartilis adja. A dobozban található vonal a mediánt, vagyis a középső számértéket adja meg. Sorba rendezett minták esetében az alsó kvartilis az a vonal, amely alatt az össze minta 25%-a található. Felső kvartilis esetében ez a felső 25%-ot jelenti. Tehát a kvartilisek között található a mintahalmaz mediánhoz közel eső 50%-ot adja meg.

6. Célkitűzések

A dolgozatom célja az IgG fehérjék glikozilációs mintázatának a vizsgálata volt Appendicitis és kontroll csoport között. Az ehhez kapcsolódó kitűzött célok a következők voltak:

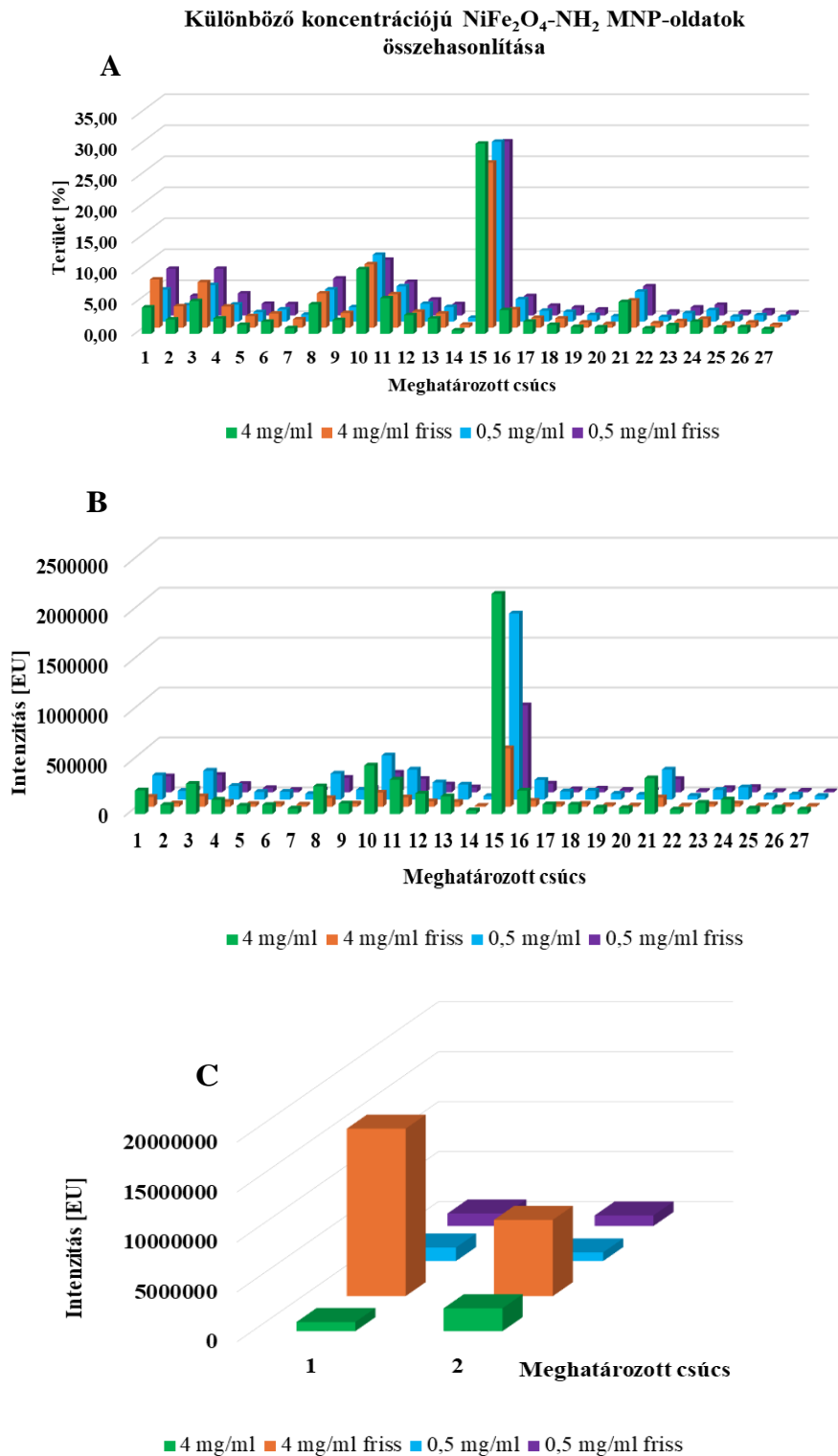
- Előteszt elvégzése arra vonatkozóan, hogy van-e hatása a vízben diszpergált $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP koncentrációjának, illetve az oldat elkészítési időpontjának arra, hogy az MNP milyen hatékonysággal képes megkötni az N-glikánokat.
- Protein G oszloppal történő IgG izolálás előtesztelése, majd a módszer nagy mintaszámú alkalmazása. Az izolálás során megfelelő mennyiségű IgG kinyerése a szérumból.
- Az izolált IgG-ről leemésztett N-glikánok analízise UPLC-MS módszerrel, amely választ ad a N-glikánok további alkalmazásának az alkalmasságára.
- A kapott értékek alapján az Appendicitis és kontroll csoport összehasonlítása, amely során cél az N-glikozilációban fellépő változások, korrelációk keresése.
- A magas mintaszámú N-glikán elemzésének teljesen automatizált kiértékelésének a kivitelezése.

7. Eredmények

7.1. NiFe₂O₄-NH₂ MNP-oldat előtesztelése izolált IgG tisztításához

Az izolált IgG minták tisztítása előtt elvégeztem egy tesztet, ahol összehasonlítást végeztem NiFe₂O₄-NH₂ MNP-oldatok között. A teszt során humánszérumból N-glikánokat izoláltam, amit az 5.6. pontban leírt lépések alapján végeztem. A teszt arra irányult, hogy megnézzem a 0,5 mg/ml-es, és 4 mg/ml-es koncentrációjú vízben diszpergált NiFe₂O₄-NH₂ MNP-oldat között van-e különbség a glikán megkötési hatékonyságban. Ezen belül mindkét esetben megnéztem, hogy van-e különbség a frissen készített, és a már korábban diszpergált nanorészecskék között a tisztítás reprodukálhatóságára nézve. A kívánt végkoncentrációjú oldatokat 40 mg/ml törzsoldatból kihígítva készítettem el. Minden típushoz két párhuzamos mintaelőkészítést végeztem, amelyet a kiértékelésnél átlagoltam. A mérést Waters Acquity UPLC-vel végeztem, FLR detektorral való azonosítással. A teszt során 27 darab csúcs került kiintegrálásra, amelyből meghatároztam a csúcsokhoz tartozó intenzitást, és a terület%-okat. Háromszori mérést végeztem, majd az eredményeket átlagoltam, melyek eredményét a 3. ábra oszlopdiaagramja mutat be. Meghatároztam még továbbá a szabadfestékekből kapott csúcs intenzitásokat is. Ez a 5.6.2. pontban alkalmazott fluoreszcens jelölőnek felel meg, amit azért vizsgáltam, hogy a MNP-ről kapjak információt hogy mennyire hatékonyan tisztítja meg a felesleges jelölőtől a mintát. A kapott eredményekről elmondható, hogy a legtöbb csúcsához tartozó terület%-ok arányosságot mutatnak mind a négy típusú MNP között (3. ábra A). Az intenzitások tekintetében a nem frissen készített 0,5 mg/ml-es és 4 mg/ml-es NiFe₂O₄-NH₂ MNP-oldatok mutatták a legnagyobb intenzitást (3. ábra B; zöld, világoskék) amelyek 2-3szoros intenzitás jellemezte. A szabadfesték intenzitásából megállapítható, hogy a frissen készített 4 mg/ml-es MNP-oldat által végzett tisztítás során jelentősen több festék maradt, mint a többi esetben (3. ábra C; narancs). Ebben a három esetben (3. ábra C; zöld, kék lila).

A kapott eredmények alapján az egymással nem összefüggő terület%-ok intenzitások miatt nem találtam összefüggést aközött, hogy van-e különbség különböző koncentrációjú, és frissen én nem frissen vízben diszpergált NiFe₂O₄-NH₂ MNP-oldat között. A teszt eredményétől függetlenül a 0,5 mg/ml-es MNP-oldatot használtam a munkám további részében, az IgG-ről származó glikánok tisztításához, mivel a kisebb MNP koncentrációval (0,5 mg/ml MNP) is ugyanakkora glikán megkötési hatékonyságot tapasztaltam, mint a nagyobb MNP koncentráció (4 mg/ml MNP) esetében. Mivel a mérési hatékonyság egyenlőnek bizonyult, így költséghatékonyabb kevesebb MNP-t felhasználni egy adott minta tisztításához.



3. ábra: A különböző koncentrációjú vízben diszpergált $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-oldattal való glikán mintaelőkészítés során meghatározott terület%-ok (A), és intenzitások (B), továbbá a szabadfesték kapott intenzitása (C)

7.2. Protein G oszlop tesztelése szérumból IgG izolálására

A klinikai szérumból minták Protein G oszloppal történő IgG izolálási folyamata előtt elvégeztem egy előtesztet, ami a Protein G oszlopról történő eluálásra irányult. A teszt során gyártói protokoll szerint 2 humán szérumból mintát 0,1 M Glicin-HCl-el eluáltam amit utána 1 M TRIS (pH 8,5) pufferrel semlegesítettem. Ezek a B1,B2 jelölést kapták.

Annak érdekében, hogy igazoljam az IgG elválasztás sikerességét, fehérje koncentrációt mértem NanoDrop berendezés segítségével. A koncentráció meghatározása fontos még, mivel a koncentráció ismeretében tudunk pontos és azonos mennyiségű IgG fehérjét felvinni majd az SDS-PAGE-re. Mindkét minta esetében 1,9 µg/µl körüli koncentrációt kaptam, tehát az IgG fehérje jelenléte kimutatható a mintában.

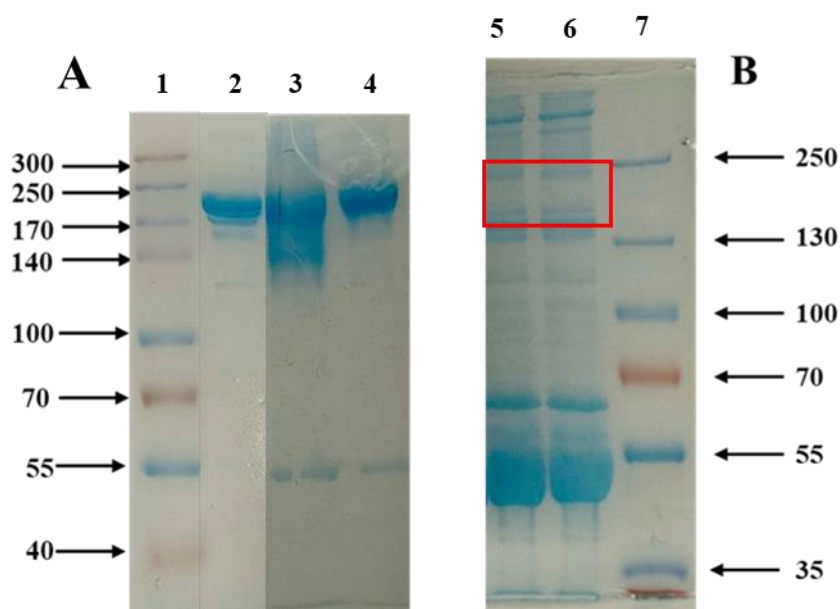
4. táblázat: NanoDrop készülékkel mért 0,1 M Glicin-HCl-el eluált IgG koncentráció értékei az előteszttekkel elvégzett kísérletekben

Minta	Mérés 1 [µg/µl]	Mérés 2 [µg/µl]	Mérés 3 [µg/µl]	Átlag [µg/µl]	Minta mennyisége [µl]
B1	1,957	1,867	1,891	1,905	400
B2	1,879	1,841	1,898	1,873	400

Koncentráció mérést követően SDS-PAGE módszert alkalmaztam, hogy igazoljam az IgG jelenlétét az eluátumokban. A kísérletek során pozitív kontrollként a Rituximab monoklonális antitestet használtam, amely kiválóan alkalmas az SDS-PAGE módszerben való alkalmazásra. A pozitív kontrollból, és előzőleg izolált mintákból is egységesen 10 µg-ot vittem fel a géltre, amelynek eredményeként a gélen megjelenő fehérjesáv mérete összehasonlítható az izolált IgG minták sávjaival. Továbbá az SDS-PAGE során lefuttattam a szérumból végzett első mosási lépésből származó, úgynevezett „binding” frakciót is, hogy a kötődési lépés során megmaradt fehérjéket vizsgáljam. A SDS géltre felvitt minták sorrendje:

- 1: 5 µl 1-es protein marker, 4,6 kDa – 300 kDa
- 2: 1 µl Rituximab (pozitív kontroll)
- 3,4: 5 µl 0,1 M Glicin-HCl-el eluált IgG
- 5,6 1 µl IgG-t nem tartalmazó binding frakció
- 7: 5 µl 2-es protein marker, 10 kDa-200 kDa

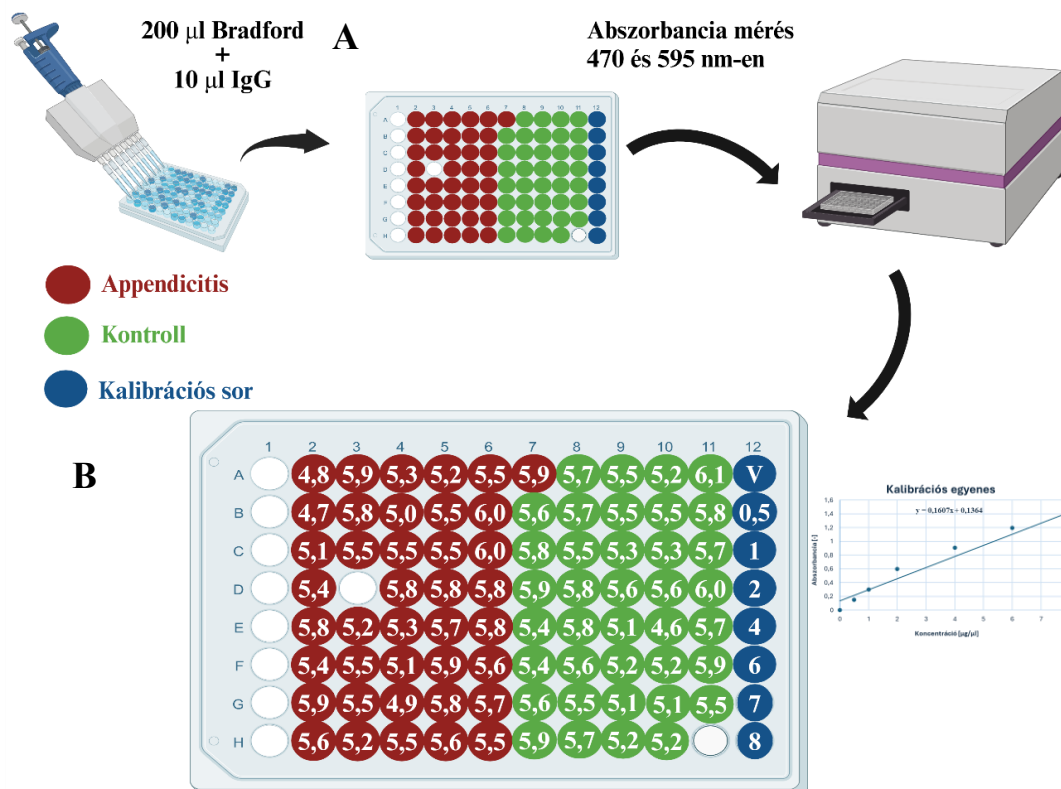
A 4. ábra A gél fotóján jól láthatóan a gyártói által megadott protokollal sikerült megkötni a IgG-eket az oszlopon. Továbbá megfigyelhető, hogy az IgG molekulatömeg sávjában (~180 kDa) egyáltalán nem, vagy nagyon kis mennyiségben detektálható fehérje (piros keret). Az 50-55 kDa-nál jelentkező erős sáv a szérumban legnagyobb arányban található fehérje az albumin.



4. ábra: 0,1 M Glicin-HCl-el eluált IgG (A) és binding (B) fehérje SDS-PAGE elválasztása

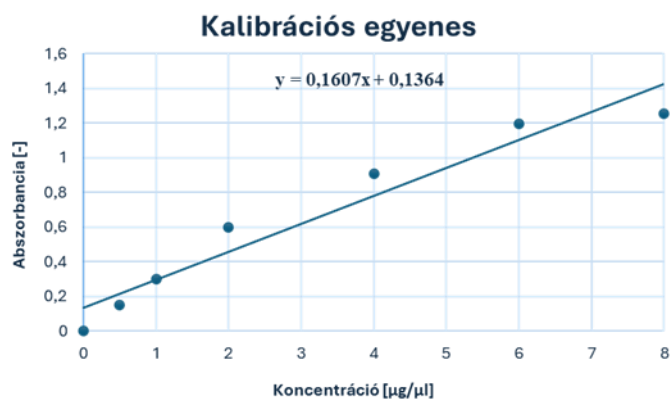
7.3. Gyermekkori vakbélgyulladás és kontroll csoportok szérum mintáiban lévő IgG izolálása

A 38 vakbélgyulladással diagnosztizált betegektől vett szérumintából és 40 mintát tartalmazó kontroll csoport szérumintáiból Protein G oszloppal IgG fehérjét izoláltam, melynek eredményességét fehérje koncentráció mérésével igazoltam. A fehérje koncentrációt Bradford-reagens alkalmazásával történő módszerrel határoztam meg, egy Microplate Olvasó segítségével. A mérés folyamatát és a kiszámolt koncentrációkat a 5. ábra szemlélteti. A 96-lyukú mikrolemezbe először 200-200 μ l Bradford-reagenst mértem, majd sorban bemértem az Appendicitis mintacsoportból (5. ábra, A, piros pontok) és a kontroll mintacsoportból izolált fehérje mintákból (5. ábra, A, zöld pontok) 10-10 μ l-t. A további lyukakba a kalibrációs sor (5. ábra, A, kék pontok) tagjai (vak, 8; 6; 4; 2; 1; 0,5 μ g/ μ l koncentrációjú Rituximab monoklonális antitestet tartalmazó kalibrációs sor) kerültek, szintén 10-10 μ l térfogatban. A kalibrációs sor koncentráció és mért abszorbancia értékeiből kalibrációs egyenest és az egyenesre illesztett egyenletet határoztam meg (6. ábra).



5. ábra: A Microplaterere felvitt Appendicitis (Piros pontok, A és B), Kontroll (Zöld pontok A és B), és kalibrációs sor (Kék pontok A és B) tagjai. Továbbá a meghatározott koncentrációk (B) µg/µl-ben megadva.

A 6. ábrán bemutatott kalibrációs egyenesre illesztett kalibrációs egyenletbe helyettesíttem az Appendicitis és a kontroll mintacsoportok mintáihoz kapott abszorbancia értékeket, majd az egyenlet segítségével kiszámoltam a minták fehérje koncentrációját, amit az 5. ábra B részében tüntettem fel.



6. ábra: A kalibrációs sor abszorbanciáiból meghatározott kalibrációs egyenes és az egyenes egyenlete

A két mintacsoportra meghatároztam az átlagos fehérje koncentrációt és a hozzá kapott szórás értékeket, amit az 5. táblázatban foglaltam össze. Az átlagos koncentráció értékek megfelelnek a szakirodalomban előírt kiindulási IgG koncentrációnak [35], valamint a szórás is 0,5 szórás érték alatt van, így a minták közel azonos koncentrációban tartalmazznak IgG fehérjét, ami megfelelőnek minősíthető.

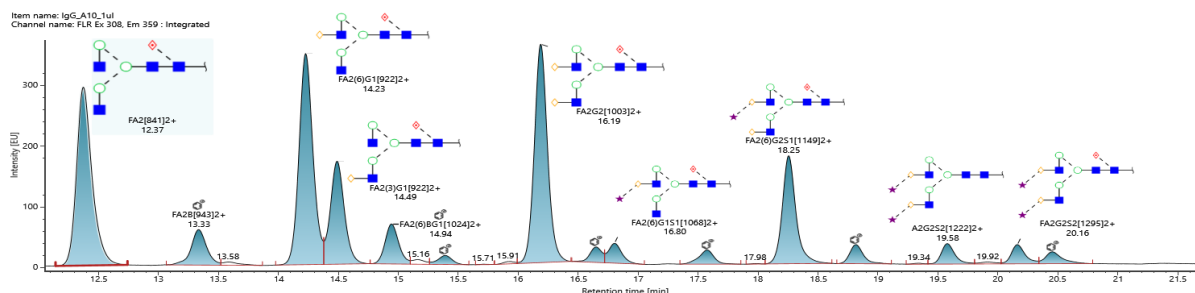
5. táblázat: Bradford-reagenssel meghatározott beteg és kontroll csoport átlag IgG koncentrációi

Csoport	Kontroll	Appendicitis
Átlag koncentráció [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	5,51	5,51
Szórás	0,31	0,33

Az eredmények alapján elmondható, hogy az IgG izolálás sikeres volt és a minták megfelelő mennyiségben tartalmazznak IgG glikoproteint ahhoz, hogy elvégezzem az IgG glikán analízist, amihez minimum 10 μg IgG fehérje szükséges [37].

7.4. Izolált IgG minták glikozilációs analízise és statisztikai eredményei

Az IgG glikán analízis mintaelőkészítési lépéseit az 5.6. pont alapján végeztem el, majd az 5.7. pontban leírt Waters Acquity I-class berendezéssel mértem és Waters Xevo G2-XS QToF tömegspektrométerrel elemeztem. A kapott adatokat Unifi szoftverbe importáltam. Az Unifi által automatikusan elvégzett kiértékelés során összesen 77 darab kromatogram került integrálásra, amiken 9 különböző glikán struktúra került azonosításra a retenciós idő és m/z értékük alapján, ahogy azt a 7. ábra is mutatja. Az analízishez tartozó statisztikát csak 39 Appendicitis betegnél végeztem el, mivel az egyik mintának nem lett jó a fluoreszcens intenzitása, ami a nem megfelelő mintaelőkészítésből adódhatott.



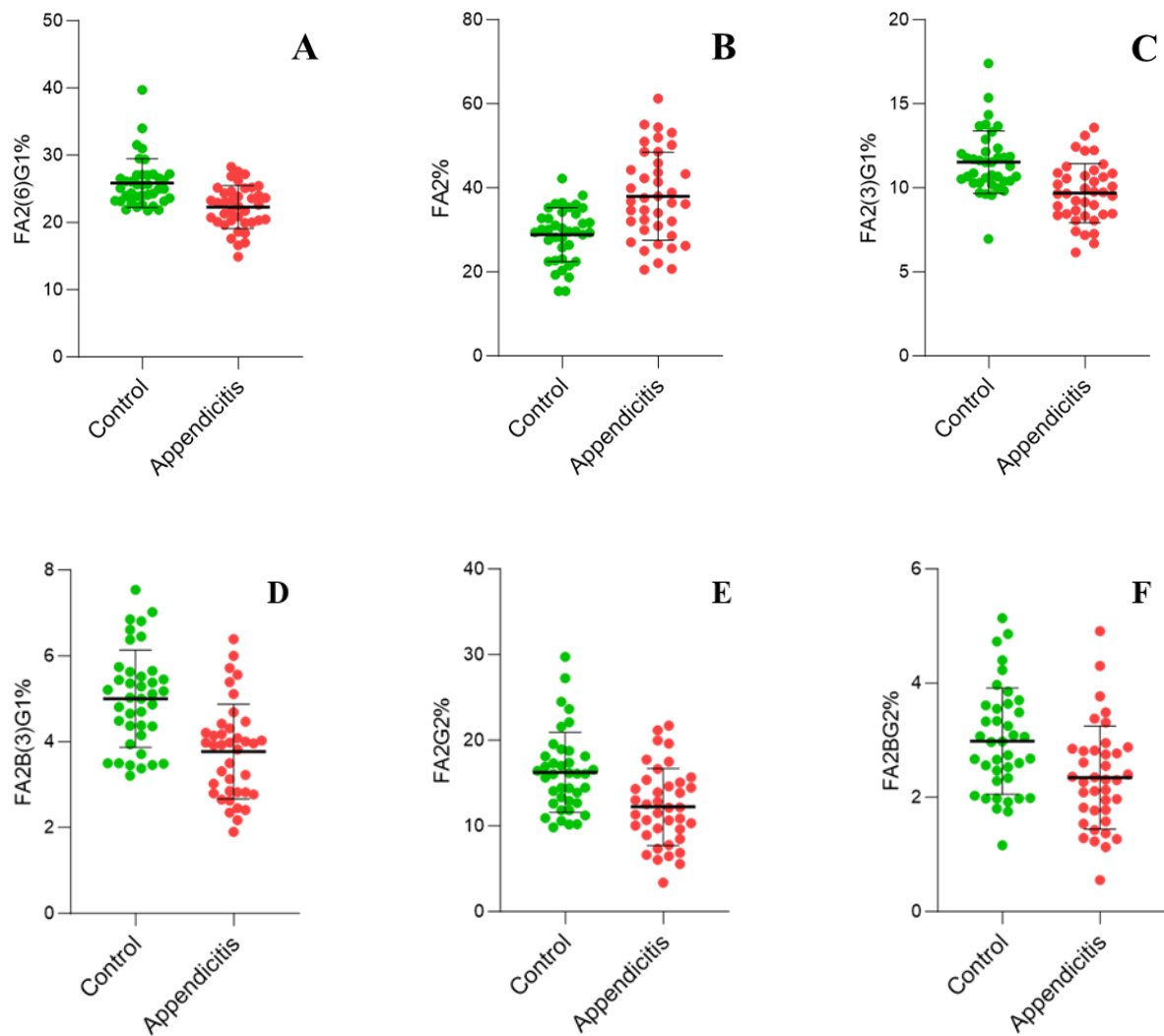
7. ábra: Unifi szoftver által integrált kromatogram

A szoftveres integrálásból megkaptam az azonosított glikán struktúrák csúcs alatti terület% eloszlását, amit a 3.számú melléklet tartalmaz. Ezeket az adatokat további statisztikai tesztekhez használtam fel, mint a Mann-Whitney kétmintás U-próba, a Spearman-rangkorrelációs teszt és PCA analízis.

7.4.1. Mann-Whitney-kétmintás U-próba

A kromatogramok integrálása során az UNIFI szoftverrel nyert terület százalékos adatokat importáltam az SPSS szoftverbe beteg és kontroll csoportok szerint, majd Mann-Whitney kétmintás U-próbával szignifikáns különbségeket kerestem a mintacsoportok között a különböző glikán struktúrákra nézve. A próbához 0,05-ös szignifikancia szintet (α) használtam, azaz 95%-os megbízhatósági intervallumot állítottam be. A teszt eredményeit a 8.ábra tartalmazza, ahol a szignifikáns eredményeket is feltüntettem. A szignifikáns eltérést mutató glikán struktúrák terület% adatait szemléltetés céljából GraphPad szofver segítségével pontdiagramon ábrázoltam, amit a 8. ábra mutat be. A vastag vonalak jelzik a mintacsoportok mediánját, míg a vékony vonalak (kvartilisek) közötti része a minták 25%-75% tartományát (a minták mediánhoz közel eső 50%-át).

Az elemzés során hat glikán struktúránál találtam szignifikáns eltérést a mintacsoportok között. Emelkedést mutatott Appendicitisben szenvedőknél a FA2 glikánok szintje (8. ábra, B). Öt glikán struktúra esetén elmondható, hogy szintjük a vakbélgyulladással diagnosztizált minták esetében szignifikáns csökkenést mutatott: FA2(6)G1 (8. ábra, A), FA2(3)G1 (8. ábra, C), FA2B(3)G1 (8. ábra, D), FA2G2 (8. ábra, E), és a FA2BG2 (8. ábra, F). A Mann-Whitney teszt szignifikáns eredményeit a 6. táblázat tartalmazza. A táblázatban feltüntettem a szignifikáns különbségeket mutató struktúrák átlagos terület%-os értékeit a beteg és a kontroll mintacsoportokra szedve.



8. ábra: Szignifikáns eltérést mutató N-glikánok pontdiagramjai

6. táblázat: A szignifikáns eltérést mutató struktúrák statisztikai eredményei

Glikán struktúra neve	Átlag terület%		Szórás		Medián		Szignifikancia Mann-Whitney-teszt (* \leq 0,05)
	Beteg	Kontroll	Beteg	Kontroll	Beteg	Kontroll	
FA2	37,99	28,89	10,49	6,41	36,8	29,65	*0,001
FA2(3)G1	22,28	23,45	3,19	7,59	22,63	24,97	*0,001
FA2(6)G1	9,68	11,52	1,75	1,88	9,66	11,29	*0,001
FA2B(3)G1	3,77	4,97	1,11	1,13	3,93	5,02	*0,001
FA2G2	12,22	16,24	4,49	4,73	12,14	16,07	*0,001
FA2BG2	2,35	2,98	0,90	0,94	2,31	2,86	*0,004

7.4.2. Heatmap analízis

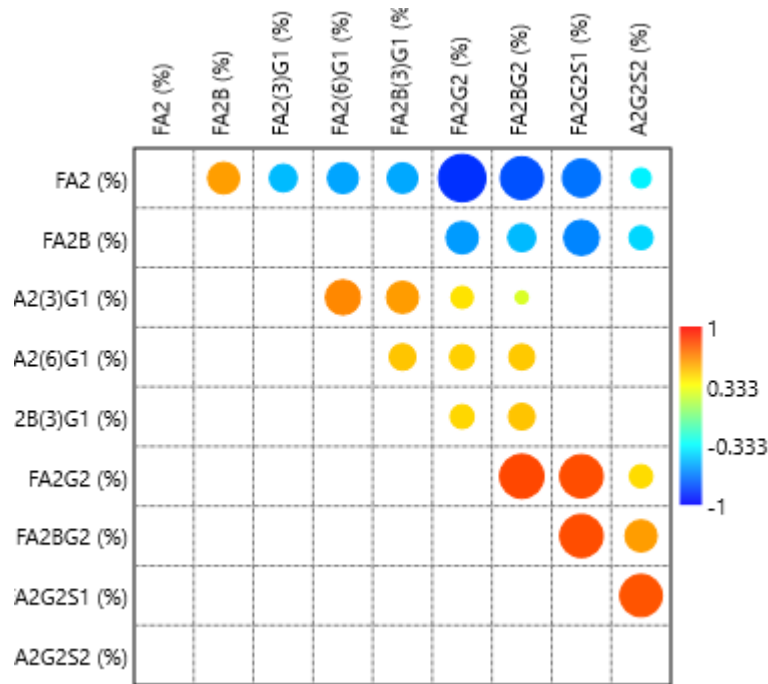
A kapott terület% adatokat további elemzésre használtam, ami során megnéztem, hogy vannak-e olyan N-glikán struktúra párok, amelyek között korreláció van az Appendicitis-mintacsoportra jellemzően. Ehhez Spearman-féle rangkorrelációs tesztet használtam, a Past 4.0 szoftverben, amit heatmap diagramon ábrázoltam (9. ábra). A kilenc azonosított glikán struktúrát állította a szoftver párba, így kapva meg az adatmátrixot, amiben 36 különböző variációra kerestem a korrelációt. A 9. ábrán látható heatmap diagramon a korreláció erősségét a színnel kitöltött karikák mérete jelzi, míg a negatív korrelációt a kék szín, a pozitív korrelációt pedig piros színnel jelölte a szoftver. 25 esetben figyelhető meg 0-tól eltérő korreláció, ezek között 7 esetben már erősnek mondható korrelációt figyeltem meg két glikán struktúra között.

Megállapítható, hogy erősen negatív korreláció van az alábbi N-glikán struktúrák között, ami azt jelenti, ha az egyik struktúra szintje emelkedik, akkor a másiké csökken a szérumban a vakbélgyulladás hatására:

- FA2-FA2G2,
- FA2-FA2BG2
- FA2-FA2G2S1.

Erős pozitív korreláció figyelhető meg az alábbi N-glikán párok között, ami azt jelenti, hogy a két glikán struktúra együtt mozognak, vagyis ha az egyik struktúra szintje emelkedik, akkor a másik is növekedik vakbélgyulladás hatására a szérumban IgG-n:

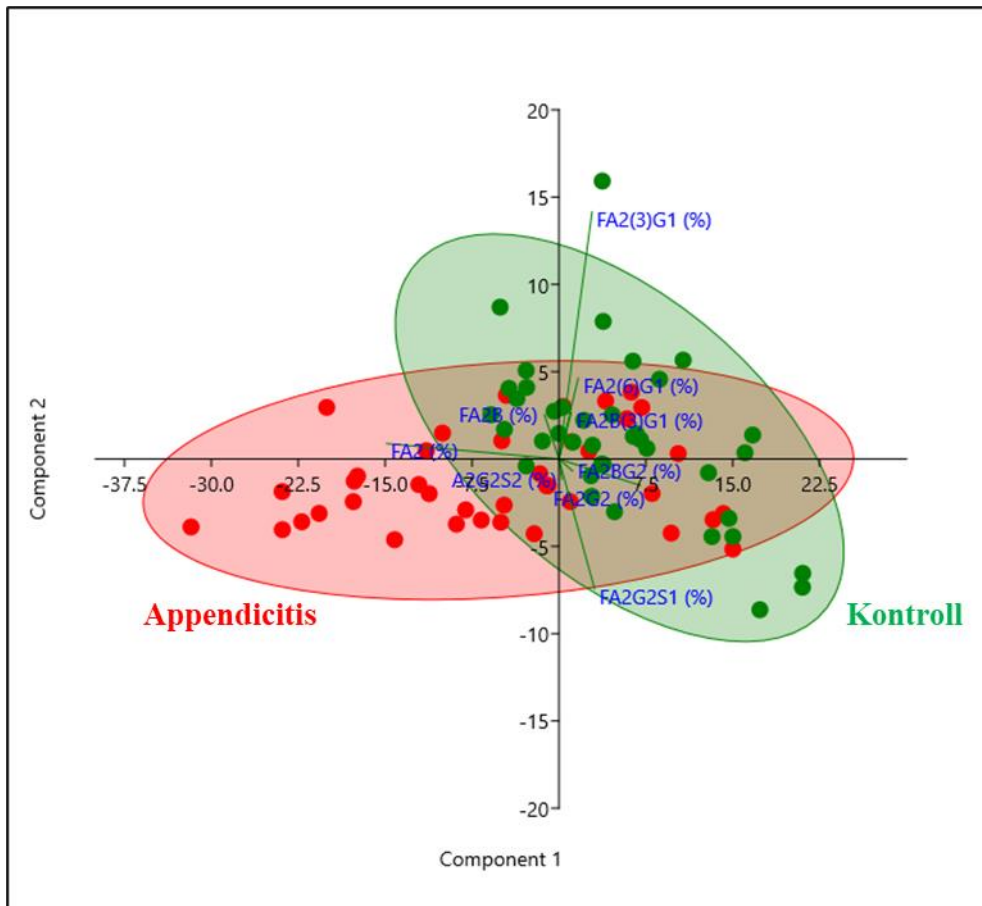
- FA2G2-FA2BG2,
- FA2G2-FA2G2S1,
- FA2BG2-FA2G2S1,
- A2G2S1-A2G2S2.



9. ábra: Heatmap analízis N-glikán struktúrák között korrelációs összehasonlításra beteg csoporton belül

7.4.3. PCA analízis

A 10. ábrán grafikusán ábrázolt PCA analízisen két klaszter látható. Piros halmazban az Appendicitis, míg zöld színű halmazban a kontroll csoport minta tagjai. Az ábrán jól láthatóan nincsenek jól elkülönülő klaszterek, és nagyrészt átfedésben vannak, de jelen vannak olyan glikán struktúrák (mint vektorok) amik nagy mértékben hozzájárulnak az elváláshoz. Az Appendicitis csoport elválásához járul hozzá az FA2 glikán, ami alátámasztja a heatmap analízis eredményeit, ahol az FA2 8 másik glikán struktúrával volt valamilyen korrelációban (9. ábra). A kontroll csoport elválásához teljes mértékben járul hozzá a FA2(3)G1. Ez alátámasztja az elvégzett Mann-Whitney-tesztet, ahol szignifikáns különbség volt Appendicitis és kontroll között (8. ábra, B). A FA2G2S1 szintén egy jelentős vektornak számít, viszont iránya a két csoport metszetére irányul.



10. ábra: Főkomponensanalízis (PCA) grafikus ábrázolása

A PCA teszt eredményei összhangban állnak a szakirodalomban leírtakkal, miszerint a glikán struktúrák gyakran multifunkcionális biomarkerekként szolgálnak, és a csoportok elkülönítésében való szerepük jelentősen javíthatja a biomarker-elemzések megbízhatóságát [36]. Az ábrán tapasztalható átfedés azonban rávilágít arra, hogy a PCA elsősorban az adatok redukciójában hasznos, de nem mindig biztosít teljes diszkriminációt a csoportok között.

8. Összefoglalás

A munkám során 40 Appendicitisben szenvedő és 38 kontroll személy IgG N-glikozilációs mintázatát vizsgáltam. Előtesztet végeztem arra vonatkozólag, hogy van-e különbség N-glikánok megkötésére használt különböző koncentrációjú $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-oldatok között. Ennek elsődleges célja a glikán mintaelőkészítés és UPLC mérési módszereknek a megismerése volt, továbbá megismertem a MNP glikán megkötési hatékonyságát. Ez a teszt azért is volt fontos hogy a klinikai szérum minták előkészítését már kisebb tapasztalattal tudják kivitelezni. Az IgG-k szérum mintából történő izolálására Protein G oszlopot használtam, amelyen először előtesztet végeztem mely során a gyártói utasítás szerint 0,1 M Glicin-HCl-el eluáltam, majd 1 M TRIS (pH8,5) pufferrel semlegesítettem az izolált IgG mintákat. Az elválasztás eredményességét SDS-PAGE-el igazoltam. Az izolálást követően, Bradford-reagens jelenlétében megmértem a minták abszorbanciáját mikrolemez olvasóval, majd a kalibrációs sor alapján meghatároztam a koncentrációkat. Ezt követte a N-glikánok fehérjeláncról történő lehasítását végeztem PNGaseF enzim segítségével. Ezután végeztem el a Procainamid-HCl-el történő fluoreszcens jelölést, amely a FLR-el való detektáláshoz szükséges. A MNP-vel történő tisztítás során a már jelölt glikánokat tisztítottam meg az esetleges enzim, és puffer só szennyeződésektől, amely szükséges ahhoz hogy pontos és hatékony eredményeket kapjunk az elválasztás során, amelyet Waters I-class ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfiai berendezéssel (UPLC) kerültek elválasztásra és fluoreszcens módon detektálásra, illetve Waters Xevo-G2-XS QToF tömegspektrométerrel azonosításra. Ennek során kilenc különböző N-glikán struktúra kromatogramját és m/z arányát azonosítottam. A kromatogramok Unifi szoftverrel történő integrálása során kapott terület % adatokat különböző statisztikai tesztek alá vontam, amelyek során a két csoport glikozilációs mintázatai közötti különbséget kerestem. Kétmintás Mann-Whitney U-próba során 95%-os szignifikancia szint mellett hat glikán struktúra mutatott szignifikáns eltérést az Appendicitis és kontroll csoport között. Ezek voltak a FA2, FA2(3)G1, FA2(6)G1, FA2B(3)G1, FA2G2, és FA2BG2 glikán struktúrák. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy az Appendicitis-ben szenvedőknél a mag fukozilált, neutrális FA2 struktúra szintje emelkedik. A betegség hatására csökkentek a mag fukozilált, kétantennás, egyszeresen és kétszeresen galaktozilált (FA2(6)G1; FA2(3)G1), FA2G2), illetve ezek biszektilációt is tartalmazó FA2B(3)G1; FA2BG2) glikán struktúrák szintje. A Heatmap analízis során a meghatározott glikán struktúrák közötti fellépő pozitív és negatív korreláció kerestem. Eredményként 6 változópárhoz tartozó erős korrelációt figyeltem meg. Ez alapján elmondható, hogy erős pozitív korreláció van a FA2G2-FA2BG2, FA2G2-FA2GS1, FA2BG2-

FA2GS1, és a A2G2S1-A2G2S2 glikán struktúrák között. Emellett negatív korreláció figyelhető meg a FA2-FA2G2, és FA2 FA2BG2 struktúrák között. Főkomponens analízist (PCA) végezve megállapítottam, hogy a betegség elválásához az FA2, míg a kontroll csoportéhoz az FA2(3)G1 glikán struktúra járul hozzá. Az eredmények ismeretében megállapítható, hogy az IgG glikozilációs mintázatának változása szignifikáns különbséget mutat beteg és kontroll csoport elválasztásához, amely a jövőben segíthet az Appendicitis prognosztizálásában, és a diagnózis pontos felállításában.

9. Hivatkozások jegyzéke

- [1] A. Petroianu, “Diagnosis of acute appendicitis,” 2012. doi: 10.1016/j.ijisu.2012.02.006.
- [2] D. Moris, E. K. Paulson, and T. N. Pappas, “Diagnosis and Management of Acute Appendicitis in Adults: A Review,” *JAMA*, vol. 326, no. 22, pp. 2299–2311, Dec. 2021, doi: 10.1001/jama.2021.20502.
- [3] C. J. Wray, L. S. Kao, S. G. Millas, K. Tsao, and T. C. Ko, “Acute Appendicitis: Controversies in Diagnosis and Management,” *Curr Probl Surg*, vol. 50, no. 2, pp. 54–86, Feb. 2013, doi: 10.1067/j.cpsurg.2012.10.001.
- [4] H. LIS and N. SHARON, “Protein glycosylation: Structural and functional aspects,” 1993. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18347.x.
- [5] B. Lin, X. Qing, J. Liao, and K. Zhuo, “Role of Protein Glycosylation in Host-Pathogen Interaction,” Apr. 20, 2020, *NLM (Medline)*. doi: 10.3390/cells9041022.
- [6] S. Ramazi and J. Zahiri, “Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods,” *Database*, vol. 2021, p. baab012, Sep. 2021, doi: 10.1093/database/baab012.
- [7] T. Pongracz, O. A. Mayboroda, and M. Wuhrer, “The Human Blood N-Glycome: Unraveling Disease Glycosylation Patterns,” May 27, 2024, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/jacsau.4c00043.
- [8] I. Trbojević-Akmačić *et al.*, “High-Throughput Glycomic Methods,” Oct. 26, 2022, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.chemrev.1c01031.
- [9] A. Pal and A. K. Chakravarty, “Genetics for adaptive immunity,” *Genetics and Breeding for Disease Resistance of Livestock*, pp. 119–125, 2020, doi: 10.1016/B978-0-12-816406-8.00006-1.
- [10] G. Vidarsson, G. Dekkers, and T. Rispen, “IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions,” *Front Immunol*, vol. 5, no. OCT, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.
- [11] V. R. Gómez Román, J. C. Murray, and L. M. Weiner, “Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC),” in *Antibody Fc: Linking Adaptive and Innate Immunity*, Elsevier Inc., 2013, pp. 1–27. doi: 10.1016/B978-0-12-394802-1.00001-7.

- [12] K. T. C. Shade and R. M. Anthony, “Antibody glycosylation and inflammation,” Jun. 25, 2013, *MDPI*. doi: 10.3390/antib2030392.
- [13] G. Zauner *et al.*, “Glycoproteomic analysis of antibodies,” Apr. 2013. doi: 10.1074/mcp.R112.026005.
- [14] X. Yu *et al.*, “Profiling IgG N-glycans as potential biomarker of chronological and biological ages: A community-based study in a Han Chinese population,” *Medicine (United States)*, vol. 95, no. 28, Jul. 2016, doi: 10.1097/MD.0000000000004112.
- [15] M. Nikolac Perkovic *et al.*, “The association between galactosylation of immunoglobulin G and body mass index,” *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, vol. 48, pp. 20–25, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.08.014.
- [16] E. Lattová *et al.*, “N-Glycan profiling of lung adenocarcinoma in patients at different stages of disease,” *Modern Pathology*, vol. 33, no. 6, pp. 1146–1156, Jun. 2020, doi: 10.1038/s41379-019-0441-3.
- [17] G. C. M. Vreeker *et al.*, “Serum N-glycan profiles differ for various breast cancer subtypes”, doi: 10.1007/s10719-021-10001-3/Published.
- [18] G. C. M. Vreeker *et al.*, “Serum N-Glycome analysis reveals pancreatic cancer disease signatures,” *Cancer Med*, vol. 9, no. 22, pp. 8519–8529, Nov. 2020, doi: 10.1002/cam4.3439.
- [19] M. Šimurina *et al.*, “Glycosylation of Immunoglobulin G Associates With Clinical Features of Inflammatory Bowel Diseases,” *Gastroenterology*, vol. 154, no. 5, pp. 1320–1333.e10, Apr. 2018, doi: 10.1053/j.gastro.2018.01.002.
- [20] R. F. H. Lemmers *et al.*, “IgG glycan patterns are associated with type 2 diabetes in independent European populations,” *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, vol. 1861, no. 9, pp. 2240–2249, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.bbagen.2017.06.020.
- [21] G. N. Porcino *et al.*, “Total serum N-glycans mark visceral leishmaniasis in human infections with *Leishmania infantum*,” *iScience*, vol. 26, no. 7, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.isci.2023.107021.
- [22] W. R. Alley, B. F. Mann, and M. V. Novotny, “High-sensitivity analytical approaches for the structural characterization of glycoproteins,” Apr. 10, 2013, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/cr3003714.

- [23] E. Domínguez-Vega *et al.*, “High-resolution glycoform profiling of intact therapeutic proteins by hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry,” *Talanta*, vol. 184, pp. 375–381, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2018.03.015.
- [24] E. Komatsu *et al.*, “Characterization of immunoglobulins through analysis of N-glycopeptides by MALDI-TOF MS,” *Methods*, vol. 104, pp. 170–181, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.ymeth.2016.01.005.
- [25] L. R. Ruhaak, G. Zauner, C. Huhn, C. Bruggink, A. M. Deelder, and M. Wuhrer, “Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification,” Aug. 2010. doi: 10.1007/s00216-010-3532-z.
- [26] C. Váradi, V. Hajdu, F. Farkas, I. Gilányi, C. Oláh, and B. Viskolcz, “The analysis of human serum n-glycosylation in patients with primary and metastatic brain tumors,” *Life*, vol. 11, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2021, doi: 10.3390/life11010029.
- [27] S. C. Moldoveanu and V. David, *Essentials in modern HPLC separations*. Elsevier, 2022.
- [28] L. Nováková, L. Matysová, and P. Solich, “Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis,” *Talanta*, vol. 68, no. 3, pp. 908–918, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.talanta.2005.06.035.
- [29] Y. Guan, M. Zhang, J. Wang, and H. Schlüter, “Comparative Analysis of Different N-glycan Preparation Approaches and Development of Optimized Solid-Phase Permethylation Using Mass Spectrometry,” *J Proteome Res*, vol. 20, no. 5, pp. 2914–2922, May 2021, doi: 10.1021/acs.jproteome.1c00135.
- [30] K. R. Anumula, “Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates,” Mar. 01, 2006, *Academic Press Inc*. doi: 10.1016/j.ab.2005.09.037.
- [31] M. Pabst and F. Altmann, “Glycan analysis by modern instrumental methods,” Feb. 2011. doi: 10.1002/pmic.201000517.
- [32] K. Kodar, J. Stadlmann, K. Klaamas, B. Sergejev, and O. Kurtenkov, “Immunoglobulin G Fc N-glycan profiling in patients with gastric cancer by LC-ESI-MS: Relation to tumor progression and survival,” *Glycoconj J*, vol. 29, no. 1, pp. 57–66, Jan. 2012, doi: 10.1007/s10719-011-9364-z.

- [33] C. L. Kielkopf, W. Bauer, and I. L. Urbatsch, “Methods for measuring the concentrations of proteins,” *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2020, no. 4, pp. 97–101, Apr. 2020, doi: 10.1101/pdb.top102277.
- [34] M. Vilaj, G. Lauc, and I. Trbojević-Akmačić, “Evaluation of different PNGase F enzymes in immunoglobulin G and total plasma N-glycans analysis,” *Glycobiology*, vol. 31, no. 1, pp. 2–7, Jan. 2021, doi: 10.1093/glycob/cwaa047.
- [35] A. Bondt *et al.*, “Immunoglobulin G (IgG) Fab Glycosylation Analysis Using a New Mass Spectrometric High-throughput Profiling Method Reveals Pregnancy-associated Changes*,” *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 13, no. 11, pp. 3029–3039, 2014, doi: <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.039537>.
- [36] D. F. Lyman *et al.*, “Modeling and integration of N-glycan biomarkers in a comprehensive biomarker data model,” *Glycobiology*, vol. 32, no. 10, pp. 855–870, Sep. 2022, doi: 10.1093/glycob/cwac046.
- [37] New England Biolabs. (n.d.). *PNGase F protocol*, from <https://www.neb.com/en/protocols/2014/07/31/pngase-f-protocol>

10. Ábra- és Táblázatjegyzék

1. táblázat: IgG izolálásához használt pufferek	13
2. táblázat: SDS-PAGE módszerhez használt pufferek összetétele az adott reagens végkoncentrációjával feltüntetve	18
3. táblázat: UPLC méréshez tartozó paraméterek	22
4. táblázat: NanoDrop készülékkel mért 0,1 M Glicin-HCl-el eluált IgG koncentráció értékei az előtesztekkel elvégzett kísérletekben.....	28
5. táblázat: Bradford-reagenssel meghatározott beteg és kontroll csoport átlag IgG koncentrációi	31
6. táblázat: A szignifikáns eltérést mutató struktúrák statisztikai eredményei	33
1. ábra: N-glikánok szerkezeti típusai és főbb jellemzői. Bio Render szoftverrel készítve.	6
2. ábra: Az IgG felépítése (A) és a N-glikoziláció fő helye (B) [12]	8
3. ábra: A különböző koncentrációjú vízben diszpergált NiFe ₂ O ₄ -NH ₂ MNP-oldattal való glikán mintaelőkészítés során meghatározott terület%-ok (A), és intenzitások (B), továbbá a szabadfesték kapott intenzitása (C)	27
4. ábra: 0,1 M Glicin-HCl-el eluált IgG (A) és binding (B) fehérje SDS-PAGE elválasztása.	29
5. ábra: A Microplatere felvitt Appendicitis (Piros pontok, A és B), Kontroll (Zöld pontok A és B), és kalibrációs sor (Kék pontok A és B) tagjai. Továbbá a meghatározott koncentrációk (B) µg/µl-ben megadva.	30
6. ábra: A kalibrációs sor abszorbanciáiból meghatározott kalibrációs egyenes és az egyenes egyenlete.....	30
7. ábra: Unifi szoftver által integrált kromatogram	31
8. ábra: Szignifikáns eltérést mutató N-glikánok pontdiagramjai	33
9. ábra: Heatmap analízis N-glikán struktúrák között korrelációs összehasonlításra beteg csoporton belül	35
10. ábra: Főkomponensanalízis (PCA) grafikus ábrázolása.....	36

11. Mellékletek

1. számú melléklet: Appendicitis (A) és Kontroll (C) minták koncentrációi Bradford-reagens használatával

Koncentráció [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]					Koncentráció [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]				
Minta	1.	2.	3.	Átlag	Minta	1.	2.	3.	Átlag
A1	4,90	4,85	4,65	4,80	C1	5,69	5,71	5,53	5,64
A2	4,82	4,72	4,56	4,70	C2	6,25	5,59	5,40	5,75
A3	5,17	5,06	4,96	5,06	C3	5,69	6,10	5,86	5,88
A4	5,58	5,46	5,26	5,44	C4	5,42	5,54	5,35	5,44
A5	5,95	5,79	5,65	5,80	C5	5,63	5,31	5,14	5,36
A6	5,53	5,43	5,22	5,40	C6	6,00	5,51	5,33	5,61
A7	5,99	5,87	5,67	5,85	C7	5,93	5,98	5,74	5,89
A8	5,78	5,65	5,44	5,62	C8	5,91	5,67	5,47	5,68
A9	6,02	5,89	5,73	5,88	C9	5,70	5,78	5,60	5,69
A10	5,96	5,80	5,64	5,80	C10	5,68	5,45	5,27	5,47
A11	5,67	5,56	5,37	5,53	C11	6,02	5,73	5,52	5,76
A13	5,31	5,22	5,03	5,19	C12	5,82	5,87	5,67	5,79
A14	5,61	5,49	5,29	5,46	C13	5,58	5,70	5,53	5,60
A15	5,59	5,50	5,31	5,47	C14	5,82	5,48	5,28	5,52
A16	5,30	5,20	5,00	5,17	C15	5,76	5,69	5,49	5,65
A17	5,38	5,29	5,07	5,25	C16	5,62	5,52	5,35	5,50
A18	5,13	5,01	4,85	5,00	C17	5,63	5,49	5,30	5,47
A19	5,63	5,49	5,33	5,48	C18	5,46	5,33	5,17	5,32
A20	5,99	5,87	5,65	5,84	C19	5,78	5,66	5,46	5,64
A21	5,45	5,33	5,13	5,30	C20	5,21	5,10	4,93	5,08
A22	5,28	5,15	4,97	5,13	C21	5,33	5,23	5,07	5,21
A23	5,06	4,96	4,79	4,94	C22	5,20	5,06	4,88	5,05
A24	5,71	5,56	5,37	5,54	C23	5,33	5,16	4,97	5,15
A25	5,37	5,21	5,03	5,20	C24	5,36	5,25	5,08	5,23
A26	5,65	5,55	5,35	5,52	C25	5,63	5,55	5,36	5,52
A27	5,65	5,50	5,31	5,49	C26	5,38	5,29	5,12	5,26
A28	5,97	5,81	5,60	5,79	C27	5,69	5,62	5,39	5,57
A29	5,84	5,71	5,49	5,68	C28	4,69	4,61	4,46	4,59
A31	5,92	6,04	5,83	5,93	C29	5,30	5,20	5,00	5,17
A32	5,90	5,87	5,67	5,81	C30	5,18	5,07	4,91	5,05
A33	5,44	5,74	5,54	5,57	C31	5,32	5,20	5,04	5,19
A34	6,07	5,27	5,06	5,47	C32	6,22	6,07	5,88	6,06
A35	6,36	5,94	5,73	6,01	C33	5,90	5,78	5,60	5,76
A36	5,86	6,23	6,03	6,04	C34	5,86	5,76	5,54	5,72
A37	6,06	5,72	5,51	5,76	C35	6,20	6,05	5,85	6,03
A38	5,76	6,00	5,75	5,84	C36	5,81	5,71	5,50	5,67

A39	5,90	5,56	5,40	5,62	C37	6,06	5,92	5,71	5,90
A40	5,59	5,79	5,62	5,67	C38	5,57	5,46	5,31	5,45
A43	6,01	5,37	5,20	5,53					
A44	5,91	5,93	5,76	5,87					

2. számú melléklet: Appendicitis (A) és Kontroll (C) csoport mintáinak abszorbanca értékei

Abszorbanca [-]					Abszorbanca [-]				
Minta	1.	2.	3	Átlag	Minta	1.	2.	3	Átlag
A1	1,034	1,025	1,028	1,029	C1	1,194	1,223	1,228	1,215
A2	1,005	1,008	1,008	1,007	C2	1,316	1,196	1,199	1,237
A3	1,08	1,082	1,1	1,087	C3	1,194	1,308	1,305	1,269
A4	1,169	1,171	1,168	1,169	C4	1,136	1,186	1,188	1,170
A5	1,241	1,251	1,256	1,249	C5	1,181	1,136	1,141	1,153
A6	1,162	1,161	1,159	1,161	C6	1,262	1,18	1,183	1,208
A7	1,259	1,26	1,261	1,260	C7	1,247	1,282	1,278	1,269
A8	1,209	1,214	1,208	1,210	C8	1,242	1,214	1,216	1,224
A9	1,262	1,266	1,274	1,267	C9	1,197	1,238	1,245	1,227
A10	1,242	1,252	1,253	1,249	C10	1,192	1,166	1,17	1,176
A11	1,189	1,191	1,192	1,191	C11	1,265	1,227	1,227	1,240
A13	1,116	1,114	1,114	1,115	C12	1,223	1,259	1,261	1,248
A14	1,174	1,178	1,174	1,175	C13	1,172	1,22	1,228	1,207
A15	1,177	1,174	1,178	1,176	C14	1,222	1,172	1,171	1,188
A16	1,11	1,112	1,109	1,110	C15	1,211	1,219	1,22	1,217
A17	1,13	1,129	1,124	1,128	C16	1,18	1,181	1,189	1,183
A18	1,07	1,075	1,073	1,073	C17	1,183	1,174	1,177	1,178
A19	1,175	1,181	1,183	1,180	C18	1,145	1,139	1,146	1,143
A20	1,258	1,259	1,257	1,258	C19	1,215	1,213	1,214	1,214
A21	1,139	1,143	1,139	1,140	C20	1,092	1,09	1,092	1,091
A22	1,099	1,107	1,102	1,103	C21	1,117	1,117	1,125	1,120
A23	1,059	1,06	1,061	1,060	C22	1,09	1,081	1,082	1,084
A24	1,189	1,199	1,192	1,193	C23	1,118	1,102	1,102	1,107
A25	1,114	1,125	1,114	1,118	C24	1,124	1,123	1,126	1,124
A26	1,188	1,187	1,187	1,187	C25	1,183	1,188	1,191	1,187
A27	1,176	1,187	1,18	1,181	C26	1,128	1,13	1,135	1,131
A28	1,245	1,255	1,244	1,248	C27	1,195	1,204	1,198	1,199
A29	1,222	1,227	1,221	1,223	C28	0,98	0,982	0,986	0,983
A31	1,295	1,244	1,298	1,279	C29	1,111	1,11	1,109	1,110
A32	1,259	1,24	1,261	1,253	C30	1,085	1,083	1,087	1,085
A33	1,229	1,141	1,231	1,200	C31	1,115	1,111	1,117	1,114

A34	1,126	1,277	1,123	1,175	C32	1,309	1,303	1,309	1,307
A35	1,274	1,339	1,274	1,296	C33	1,241	1,239	1,244	1,241
A36	1,337	1,231	1,342	1,303	C34	1,231	1,234	1,232	1,232
A37	1,225	1,274	1,224	1,241	C35	1,304	1,297	1,301	1,301
A38	1,287	1,21	1,28	1,259	C36	1,22	1,222	1,223	1,222
A39	1,19	1,24	1,199	1,210	C37	1,274	1,27	1,269	1,271
A40	1,241	1,174	1,249	1,221	C38	1,168	1,169	1,18	1,172
A43	1,149	1,263	1,153	1,188					
A44	1,272	1,243	1,281	1,265					

3. számú melléklet: Az egyes csúcsokhoz kapott terület %-ok


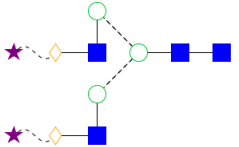
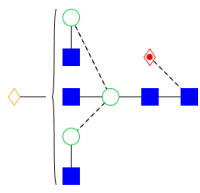
Minta	FA2 (%)	FA2B (%)	FA2(3) G1 (%)	FA2(6) G1 (%)	FA2B (3)G1 (%)	FA2G 2 (%)	FA2B G2 (%)	FA2G 2S1 (%)	A2G2 S2 (%)
A2	25,63	5,19	25,18	12,21	5,72	21,16	4,91		
A3	50,24	6,95	20,32	8,33	2,85	8,93	1,37		1
A4	41,35	6,21	19,96	8,41	3,02	11,5	2,13	6	1,42
A5	37,6	6,23	20,1	9,64	3,82	12,14	2,81	6,47	1,18
A6	38,9	6,44	20,02	8,37	4,47	11,33	2,82	5,75	1,89
A7	38,01	4,64	20,73	12,45	2,41	13,01	2,11	6,14	0,51
A8	34,63	4,78	23,28	9,96	3,13	14,47	2,31	6,36	1,08
A9	51,94	6,24	18,41	8,46	1,9	6,87	1,77	3,6	0,81
A10	20,69	4,33	22,44	10,89	4,17	21,72	3,49	10,64	1,64
A11	45,93	6,56	16,99	10,09	2,82	9,71	2,4	4,44	1,05
A13	39,91	7,79	20,88	7,19	4,14	10,32	2,55	6,12	1,1
A14	26,22	4,55	24,37	10,64	4,03	16,66	3,31	8,52	1,69
A15	25	4,28	22,94	10,37	4,21	17,75	3,77	10,52	1,16
A16	50,98	7,95	23,9	8,06	2,8	5,57		0,74	
A17	55,05	5,48	18,6	9,15	2,17	6,04	1,23	2,02	0,26
A18	48,56	8,92	19,65	7,42	3,92	7,76	1,13	2,2	0,44
A19	53,11	7,21	17,61	7,27	2,77	6,47	1,54	3,35	0,67
A20	43,31	8,03	20,47	8,66	4,42	8,47	2,09	3,99	0,56
A21	54,41	9,46	16,62	6,16	2,45	6,61	1,27	2,67	0,36
A22	44,3	4,56	23,22	9,66	2,82	10,86	1,29	3,28	
A23	61,27	9,92	14,89	6,69	2,35	3,39	0,55	0,93	
A24	42,27	6,02	24,01	8,97	3,96	10,05	1,58	2,9	0,24
A25	48,59	6,9	20,28	8,91	3,23	7,34	1,43	2,79	0,53
A26	36,16	4,62	21,65	8,05	2,63	15,09	2,3	8,24	1,26
A27	43,67	5,96	21,32	8,45	2,65	10,64	1,82	4,99	0,51
A28	32,41	6,08	22,63	9,52	3,98	14,33	2,75	7,49	0,8

A29	34	5,32	23,65	9,23	4	12,18	2,95	7,44	1,22
A31	22,1	3,6	24,64	10,2	4,08	19,62	3,38	10,83	1,55
A32	20,53	5,04	21,74	13,59	6,39	19,97	4,3	7,72	0,72
A33	36,8	7,12	23,01	10,72	5,56	10,67	2,35	3,15	0,61
A34	27,07	5,85	27,16	13,12	5,39	14,62	2,88	3,67	0,23
A35	32,03	6,53	25,19	9,73	4,69	13,91	2,36	5,09	0,47
A36	28,56	5,72	26,88	11,4	3,31	17,51	1,97	4,48	0,16
A37	32,04	7,88	25,09	12,24	5,11	12,82	1,95	2,72	0,15
A38	36,47	6,37	26,19	11,27	4,31	9,63	2,27	3,03	0,46
A39	29,96	5,74	28,28	9,77	3,93	15,68	1,78	4,55	0,32
A40	26,56	5,42	27,61	10,85	6	15,38	2,77	4,98	0,42
A43	34,69	5,11	23,57	10,56	3,5	12,53	2,61	6,33	1,12
A44	30,96	4,59	25,44	11,05	3,98	13,85	2,85	6,5	0,77
C1	36,24	8,9	23,61	9,63	5,65	10,6	2,03	2,71	0,64
C2	32,78	5,96	24,97	10,6	5,36	12,61	2,53	4,46	0,72
C3	30,1	8,06	23,15	9,71	5,03	14,44	2,74	5,91	0,87
C4	34,29	9,14	26,35	9,82	5,45	10,2	1,99	2,41	0,35
C5	35,26	8,25	25,57	10,28	5,63	10,17	1,98	2,6	0,27
C6	35,28	6,26	21,92	13,67	3,21	11,84	2,47	4,68	0,67
C7	15,43	4,31	21,78	10,2	4,7	24,5	4,23	12,86	2
C8	33,77	6,38	23,01	13,68	4,49	11,84	2,6	3,82	0,38
C9	20,35	4,01	25,09	10,67	3,45	18,76	3,61	11,53	2,53
C10	22,7	6,64	6,64	11,8	7,54	15,66	2,56	3,4	0,19
C11	15,41	3,3	3,3	10,67	5,38	23,65	4,4	13,11	1,44
C12	28,9	5,98	5,98	11,77	5,21	12,69	3,7	6,88	0,84
C13	29,38	5,36	5,36	11,85	3,38	17,03	2,67	7,41	1,06
C14	36,43	6,05	11,05	10,53	4,38	9,83	1,98	3,19	0,55
C15	27,53	11,05	39,73	17,4	6,81	16,11	3,06	4,95	0,88
C16	23,04		29,36	12,88	7,02	19,56	3,64		
C17	36,01		26,61	11,53	4,36	29,73	4,73		
C18	29,63		27,21	10,29	6,61	16,92	2,97		
C19	42,19		31	11,81	5,44	18,15	3,97		
C20	21,49		33,99		5,74	16,09	1,98		
C21	31,48		26,55	14,34	5,52	27,25	4,86		
C22	25,81	7,25	24,3	9,97	5	13,89	2,29	4,28	0,44
C23	26,37	7,13	24,37	11,63	6,45	16,45	3,07	4	0,53
C24	18,68	5,3	22,31	6,96	3,94	22,11	3,09	15,93	1,68
C25	31,04	6,07	25,65	9,57	6,85	14,42	2,66	3,42	0,32
C26	19,33	4,08	23,18	11,7	5,29	17,38	5,14	11,69	2,21

C27	38,23	6,83	24,97	10,41	3,71	11,24	1,8	2,65	0,16
C28	35,39	5,26	27,19	13,77	3,46	10,91	1,75	2,24	0,02
C29	28,19	5,42	26,1	10,38	4,66	18,14	2,34	4,76	
C30	29,67	6,15	31,55	12,03	3,49	14,07	1,16	1,9	
C31	32,69	5,94	26,09	12,15	4,15	12,93	1,92	3,71	0,42
C32	22,47	3,45	27,12	10,68	3,5	18,96	2,98	9,66	1,17
C33	29,41	6,94	23,95	10,76	4,81	14,46	2,68	5,97	1,02
C34	30,42	4,73	23,23	11,29	3,5	13,36	3,55	8,14	1,77
C35	22,43	5,08	22,4	10,87	4,37	21,6	3,49	9,68	0,09
C36	28,08	5,52	25,66	13,33	5,11	17,33	3,85		1,12
C37	31,7	4,76	23,9	15,36	4,87	16,04	3,33		0,05
C38	30,08	5,09	27,05	12,35	5,18	16,17	3,34		0,74

5. számú melléklet: Kiertékelt N-glikán struktúrák MS mérési paraméterei, és a felépítései

N-glikán struktúra	Struktúra felépítése	N-glikán struktúra	Struktúra felépítése
FA2 [Retenciós idő: 12,37 perc] [Teoretikus m/z arány: 841,87]		FA2G2 [Retenciós idő: 16,19 perc] [Teoretikus m/z arány: 1003,92]	
FA2B [Retenciós idő: 13,33 perc] [Teoretikus m/z arány: 943,39]		FA2BG2 [Retenciós idő:] [Teoretikus m/z arány: 1105,42]	
FA2(3)G1 [Retenciós idő: 14,49 perc] [Teoretikus m/z arány: 922,88]		FA2G2S1 [Retenciós idő: 18,25 perc] [Teoretikus m/z arány: 1149,45]	

<p>FA2(6)G1</p> <p>[Retenciós idő: 14,94 perc]</p> <p>[Teoretikus m/z arány: 922,88]</p>		<p>A2G2S2</p> <p>[Retenciós idő: 19,58 perc]</p> <p>[Teoretikus m/z arány: 1221,99]</p>	
<p>FA2B(3)G1</p> <p>[Retenciós idő:]</p> <p>[Teoretikus m/z arány: 1024,43]</p>			

6. számú melléklet: Az IgG izolálástól N-glikánok kiértékelésig tartó folyamatok illusztrációja BioRender szoftverrel készítve (<https://BioRender.com>)

