



---

## MISKOLCI EGYETEM

### Kerpely Antal Anyagtudományok és Technológiák Doktori Iskola

A Doktori Iskola vezetője: **Prof. Dr. Mertinger Valéria**

### **Mágneses nanorészecskék fejlesztése molekuláris biológiai alkalmazásokhoz és a szérum N-glikoziláció vizsgálata különböző patológiai állapotokban**

PhD értekezés

*Készítette:*

**Dojcsák Dalma**

*Okleveles biomérnök*

*Tudományos vezető:*

**Dr. Váradi Csaba**

Miskolc

2026

## **Témavezetői ajánlás**

Dojcsák Dalma értekezése a mágneses nanorészecskék N-glikozilációs mintázatokban való alkalmazására összpontosít különböző gyulladásos állapotok, például sclerosis multiplex, COVID-19 és a gyermekkori vakbélgyulladás vizsgálatán keresztül. Dalma kutatása kiemelkedő kreativitással és precizitással közelíti meg a glikánok analízisét, felfedezve azok diagnosztikai potenciálját és biológiai jelentőségét. A dolgozatban bemutatott módszerek innovatívak, és a mágneses nanorészecskék alkalmazása a glikánok tisztításában új perspektívákat nyújt a molekuláris biológiai kutatások számára. Dalma publikációs teljesítménye figyelemre méltó, hiszen számos rangos nemzetközi folyóiratban megjelent cikkel rendelkezik, amelyek szorosan kapcsolódnak az értekezés témájához. Kutatási eredményei nemcsak a tudományos közösség számára fontosak, hanem hozzájárulhatnak a klinikai diagnosztika fejlődéséhez is. Az értekezésében bemutatott új tudományos eredmények megerősítik Dalma kutatói érettségét és elkötelezettségét a tudományos munka iránt. Kiválóan teljesítette a kutatási feladatokat, és elkötelezettsége példaértékű. Javaslom, hogy a jövőben is folytassa kutatásait, mivel képes jelentős hozzájárulást nyújtani a molekuláris biológia és az orvostudomány területén.

---

Dr. Váradi Csaba

## Tartalomjegyzék

|                                                                                                  |        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Bevezetés.....                                                                                | - 1 -  |
| 2. Irodalmi áttekintés .....                                                                     | - 3 -  |
| 2.1. A glikoziláció molekuláris jelentősége.....                                                 | - 3 -  |
| 2.2. A glikoziláció típusai, különös tekintettel az N-glikozilációra .....                       | - 4 -  |
| 2.2.1. Komplex N-glikánok .....                                                                  | - 5 -  |
| 2.3. Az N-glikánok nomenklatúrája.....                                                           | - 6 -  |
| 2.4. Az N-glikoziláció szerepe egészséges és beteg állapotokban .....                            | - 7 -  |
| 2.4.1. Egészséges, normál állapot .....                                                          | - 8 -  |
| 2.4.2. Krónikus gyulladásos betegségek .....                                                     | - 8 -  |
| 2.4.3. Akut gyulladásos betegségek .....                                                         | - 9 -  |
| 2.5. Az N-glikoziláció analitikai vizsgálatainak kihívásai .....                                 | - 12 - |
| 2.5.1. HILIC-alapú fluoreszcens glikánanalízis áttekintése.....                                  | - 14 - |
| 2.6. A mágneses nanorészecskék jellemzése és funkciói .....                                      | - 16 - |
| 2.6.1. Mágneses nanorészecskék orvosi alkalmazásai.....                                          | - 16 - |
| 3. Célkitűzések .....                                                                            | - 18 - |
| 4. Anyagok és módszerek.....                                                                     | - 19 - |
| 4.1. Felhasznált anyagok.....                                                                    | - 19 - |
| 4.1.1. NH <sub>2</sub> -funkcionalizált ferrit alapú mágneses nanorészecskék előállításához..... | - 19 - |
| 4.1.2. N-glikán mintaelőkészítéshez és LC-MS elemzéshez .....                                    | - 19 - |
| 4.2. NH <sub>2</sub> -funkcionalizált ferrit alapú mágneses nanorészecskék előállítása.....      | - 20 - |
| 4.3. Az N-glikán-analízis mintaelőkészítési lépései .....                                        | - 21 - |
| 4.3.1. Szérumfehérjék és IgG denaturálása, glikánok enzimatiszabradítása .....                   | - 22 - |
| 4.3.2. Felszabadított glikánok fluoreszcens derivatizálása 300 mM ProA-val .....                 | - 22 - |
| 4.3.3. N-glikánok tisztítási módszerei.....                                                      | - 22 - |

|                                                                                                                                                          |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 4.3.4. A glikán-tisztítási protokoll automatizálása.....                                                                                                 | - 26 - |
| 4.4. N-glikán analízis UHPLC-MS rendszerekben.....                                                                                                       | - 27 - |
| 4.4.1. Alkalmazott Waters UHPLC-MS készülékek .....                                                                                                      | - 27 - |
| 4.4.2. Kromatográfiás és tömegspektrometriás beállítások és mérési<br>körülmények .....                                                                  | - 29 - |
| 4.5. Kiértékeléshez alkalmazott szoftverek és statisztikai tesztek.....                                                                                  | - 31 - |
| 4.5.1. IBM SPSS Statistics 25.....                                                                                                                       | - 31 - |
| 4.5.2. Past 4.02.....                                                                                                                                    | - 33 - |
| 4.5.3. GraphPad Prism 10.1.2 .....                                                                                                                       | - 33 - |
| 4.5.4. Python 3.10.0 .....                                                                                                                               | - 33 - |
| 4.5.5. GlycoWorkBench 2.1 .....                                                                                                                          | - 34 - |
| 4.6. SARS-CoV-2 ELISA immunoassay vizsgálat.....                                                                                                         | - 35 - |
| 5. Eredmények.....                                                                                                                                       | - 36 - |
| 5.1. NH <sub>2</sub> -funkcionalizált MNP-k: összehasonlítás, optimalizálás, automatizálás<br>N- glikánok megkötéséhez .....                             | - 36 - |
| 5.1.1. A különböző ferrit prekursorok hatása az N-glikánok megkötési<br>hatékonyságára.....                                                              | - 37 - |
| 5.1.2. Szárított, glikolos és vizes diszperziós közegek optimalizálása<br>különböző koncentrációk függvényében .....                                     | - 39 - |
| 5.1.3. NiFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> MNP alapú elúciós körülmények optimalizálása<br>centrifugális oszlopos referencia mellett ..... | - 43 - |
| 5.1.4. MNP-alapú módszer automatizálhatósága.....                                                                                                        | - 46 - |
| 5.2. Teljes szérum N-glikozilációs vizsgálat a gyulladásos betegségekben.....                                                                            | - 47 - |
| 5.2.1. Sclerosis multiplex.....                                                                                                                          | - 48 - |
| 5.2.2. COVID-19.....                                                                                                                                     | - 50 - |
| 5.2.3. Gyermekkori akut vakbélgyulladás .....                                                                                                            | - 54 - |
| 5.3. Eredmények megvitatása .....                                                                                                                        | - 61 - |

|                                                                                                       |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 5.3.1. Újonnan szintetizált MNP-alapú glikán tisztítási protokoll fejlesztésének összefoglalása ..... | - 61 - |
| 5.3.2. Teljes szérum N-glikozilációs vizsgálatok összefoglalása .....                                 | - 63 - |
| 6. Összefoglalás .....                                                                                | - 67 - |
| 7. Summary .....                                                                                      | - 69 - |
| 8. Új tudományos eredmények .....                                                                     | - 71 - |
| 9. Köszönetnyilvánítás .....                                                                          | - 72 - |
| 10. Értekezés alapjául szolgáló közlemények .....                                                     | - 73 - |
| 11. További, referált folyóiratokban megjelent közlemények .....                                      | - 73 - |
| 12. További, nem referált folyóiratban megjelent közlemény .....                                      | - 74 - |
| 13. Irodalomjegyzék .....                                                                             | - 75 - |

## 1. Bevezetés

A glikoziláció a fehérjékhez kapcsolódó kovalens kémiai módosulás, amely során oligoszacharid (glikán) egységek épülnek be a polipeptid lánc meghatározott funkció csoportjaihoz, kompozit makromolekulákat, úgynevezett glikoproteineket létrehozva. A glikánok szerkezeti komplexitása, elágazottsága és konformációs variabilitása jelentős mértékben befolyásolja a fehérjék fizikokémiai tulajdonságait, mint töltéseloszlás, hidrofíl tulajdonságok, térszerkezet és felületi kölcsönhatások [1, 2]. Ez a heterogenitás a fehérjék mikro- és makroszintű szerkezeti sokféleségéhez vezet, amely meghatározza kémiai kölcsönhatásait, viselkedését más molekulákkal, továbbá megőrzi a fehérjék oldatbeli (szérum, plazma) és felületi stabilitását [3]. A glikoziláció nem templátvezérelt, hanem egy enzimatikusan katalizált, környezetfüggő kémiai folyamat, amit az adott rendszer (sejt) lokális összetétele, enzimaktivitása és metabolikus állapota határoz meg [4]. Ennek következtében a glikánstruktúrák összetétele és mennyiségi megoszlása érzékeny a sejtek kémiai környezetének változásaira, mint ami egy gyulladásos folyamatban is bekövetkezik [5]. A glikozilációs típusok közül a gyulladásos állapotok jellemzésére az N-glikoziláció bizonyult a legalkalmasabbnak, mivel ez a poszttranszlációs módosítás kémiai jól definiált kötéstípuson, az aszparagin aminosav oldalláncán keresztül valósul meg [1]. Az egységes kapcsolódási mód jelentősen csökkenti a szerkezeti variabilitásból eredő bizonytalanságot, ami különösen előnyös az analitikai vizsgálatok során, ahol a reprodukálhatóság kiemelt jelentőségű [6]. Ezen túlmenően az N-glikoziláció konzervált magstruktúrával rendelkezik, amely hozzájárul a glikánstruktúrák megbízható kvalitatív és kvantitatív analitikai elemzéséhez [1].

Az N-glikoziláció analitikai vizsgálatában a lehasított glikánokat célzó módszerek között nagy felbontást és reprodukálhatóságot biztosítanak a szeparációs technikák, mint kapilláris elektroforézis (CE) és folyadékkromatográfia (LC) fluoreszcens detektorral (FLD) kapcsolva [7-9]. A szelektivitás és érzékenység tovább növelhető tömegspektrométer (MS) alkalmazásával, hogy struktúráisan is specifikus képet kapjunk a glikánmintázatokról. A glikoanalitikai elemzés hatékonyságát döntően a gyors és reprodukálható mintaelőkészítés határozza meg. A glikántisztítás a terület egyik fő szűk keresztmetszete, mivel nagy szelektivitást igényel a komplex mintamátrix komponenseivel szemben. A többlépéses eljárások miatt a mintavesztés és a feldolgozási idő minimalizálása kulcsfontosságú [7]. Napjainkban a szilárd fázisú extrakciós (SPE) módszerek között a mágneses szeparációs technikák automatizálható és gyors megoldást nyújtanak a glikánok tisztítására [10, 11]. Ide

tartozik a mágneses nanorészecske (MNP) alapú módszer, ami nem igényel centrifugálást vagy vákuum szűrést, továbbá pipettázhatóságának köszönhetően könnyen automatizálható [11, 12]. Az MNP nanoméretű tartományú, aminek köszönhetően nagyobb fajlagos felülettel rendelkezik, mint a kereskedelmi forgalomban elérhető, mikroméretű mágneses gyöngyök. Az MNP-k felszíne szabadon funkcionálizálható, ami növeli a célmolekula specifikus tisztításra való alkalmasságukat [13]. A ferrit-alapú MNP módszer N-glikán kötési tulajdonságainak finomhangolása, a különböző diszperziós közegek és elúciós pufferek szisztematikus összehasonlítása, valamint az eljárások automatizálhatóságának vizsgálata eddig nem kapott kellő figyelmet.

Az N-glikánok szerkezeti mintázatának és arányainak változásai fontos információt nyújtanak a sejtek állapotáról. A teljes szérum N-glikozilációjának vizsgálata átfogó, rendszerszintű információt szolgáltat a fiziológiai és patológiai állapotokról, nem korlátozódva egyetlen fehérjére vagy sejtípusra [14-16]. Korábbi tanulmányok igazolták, hogy autoimmun betegségekben, például sclerosis multiplexben (SM), valamint vírusfertőzésekhez társuló gyulladásos állapotokban, mint a COVID-19, a szérum és plazma N-glikozilációs mintázata megváltozik [17-21]. Az akut gyulladásos kórképek közül a vakbélgyulladás N-glikozilációs szempontból jelenleg feltáratlan terület, annak ellenére, hogy a differenciáldiagnosztika klinikai szempontból jelentős kihívást jelent.

Kutatásom során egyrészt egy új, MNP-alapú N-glikán tisztítási protokoll fejlesztését és optimalizálását tűztem ki célul. Kiemelt figyelmet fordítottam a ferrit-alapú mágneses nanorészecskék N-glikán-specifikus kötési és elúciós feltételeinek, valamint diszperziós közegeinek összehasonlítására és az eljárás automatizálhatóságára. A dolgozat másik részében három, gyulladásos betegség – SM, COVID-19 és akut vakbélgyulladás – teljes szérum N-glikozilációs mintázatának vizsgálatát mutatom be. Eredményeim kiegészítik a korábbi tanulmányokat, új szempontok bevezetésével, mint az SM esetében a nem szerinti mintacsoportosítás, a COVID-19 esetében az mRNS-vakcináltság hatásának vizsgálata, valamint egy eddig feltérképezetlen N-glikozilációs mintázat bemutatása az akut vakbélgyulladásban.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A glikoziláció molekuláris jelentősége

A fehérje glikoziláció egy olyan poszttranszlációs módosulás, amelynek során oligoszacharid egységek (glikánok) kovalens kémiai kötést kialakítva fehérjékhez kapcsolódnak, kompozit makromolekulákat, úgynevezett glikokonjugátumokat létrehozva. Ez a módosítás széles körben elterjedt az élő rendszerekben, és az eukarióta sejtekben az egyik leggyakoribb kémiai poszt-szintetikus módosításnak tekinthető [22]. A glikozilált biomolekulák jellemzően a sejtfelszínen, extracelluláris térben vagy szekretált formában fordulnak elő, ahol közvetlenül részt vesznek a sejtfelszínen történő kémiai és molekuláris kölcsönhatásokban [2].

A glikoziláció bioszintézise során a cukorprekurzorok (pl.: nukleotid-cukrok) koncentrációja, katalitikus enzimek (pl.: glikoziltranszferázok) expressziója és szelektivitása jelentősen befolyásolja a létrejövő cukor molekulák szerkezeti variabilitását. Így a glikoziláció nemcsak a fehérjék közötti különbségeket, azaz makroheterogenitást eredményezi, hanem azonos fehérjén belüli mikroheterogenitást is létrehoz [1, 23]. A glikánoldalláncok jelentősen befolyásolják a fehérjék térszerkezetét, konformációs stabilitását és felületi tulajdonságait, mint például hidratációt, sztérikus gátlást és töltéseloszlást. Mindezek meghatározzák a fehérjék oldatbeli viselkedését, aggregációs hajlamát és molekuláris felismerési képességét, ami különösen fontos komplex, többkomponensű rendszerekben, mint a humán vészérum. Például a glikánok szerepet játszanak a fehérjék életciklusának szabályozásában, azaz a rosszul hajtogatott fehérjéket glikánmintázat alapján ismerik fel a specifikus enzimek, amik a hibás konformációjú fehérjék degradációját irányítják [14, 15]. Továbbá a glikozilációs mintázatok kulcsszerepet játszanak a molekuláris felismerési folyamatokban, mivel a glikánok specifikus kölcsönhatásokat alakítanak ki a kötőpartnerekkel, ami a petesejt és a spermium közötti fajspecifikus felismerést is lehetővé teszi: a petesejt glikánjaihoz kötődő spermium lektinjei indítják el a két ivarsejt közötti fúziós reakciót [24]. A glikoziláció befolyásolja az immunválasz szabályozását, az immunrendszer felismerőképességét és meghatározza, az immunválasz kialakulását testidegen anyagok ellen [25]. Ennek következtében a glikánmintázatok változásai érzékenyen tükrözik a rendszer állapotát, és állapotfüggő molekuláris jelzőként értelmezhetők.

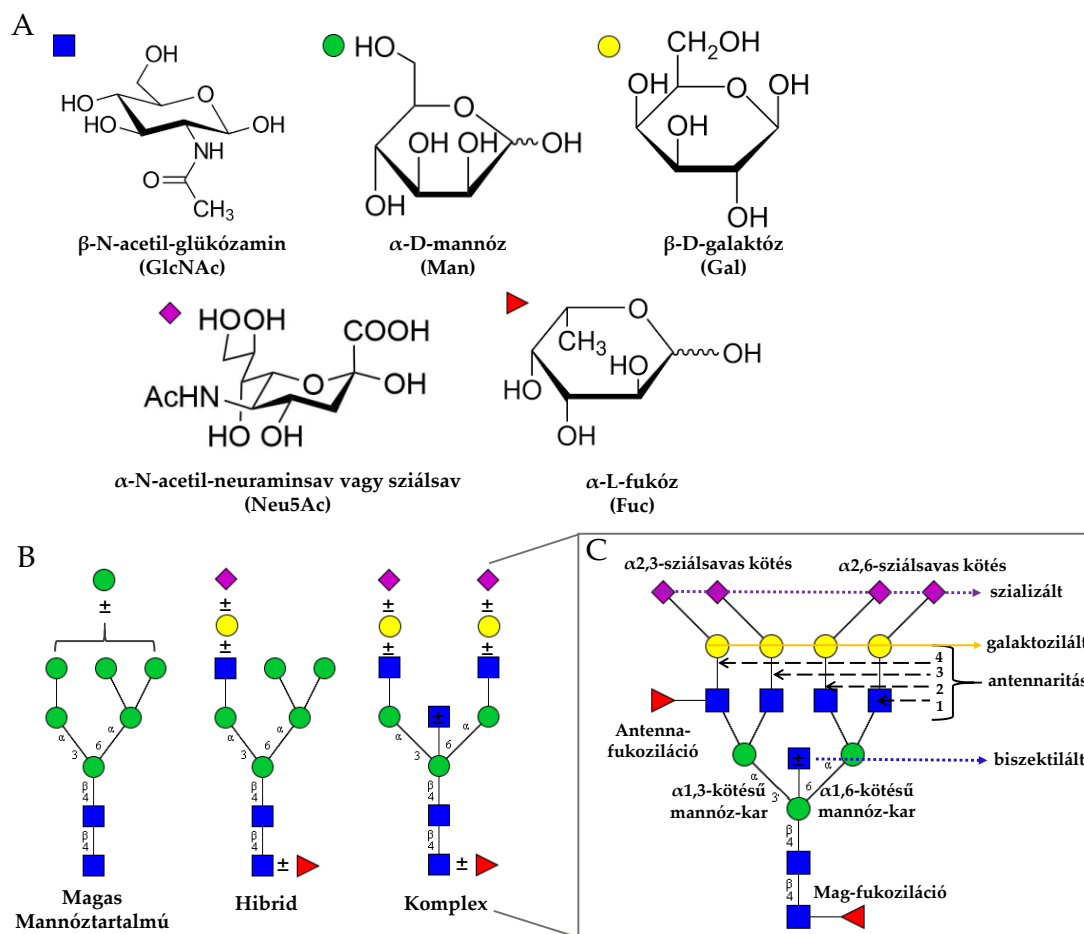


## 2.2. A glikoziláció típusai, különös tekintettel az N-glikozilációra

A glikoziláció típusait a glikán-fehérje kapcsolódási módja alapján három fő csoportba soroljuk: N-glikoziláció, O-glikoziláció és C-mannoziláció. Ezek közül az N-glikoziláció a legjelentősebb módosítás, amely a humán glikoproteinek döntő többségében jelen van [26]. Az N-glikoziláció során egy N-acetil-glükózamin (GlcNAc) egység kapcsolódik az aszparagin (Asn) oldallánc, amid nitrogénatomjához, egy jól definiált Asn-X-Ser/Thr szekvenciamotívumon keresztül, ahol az X bármely aminosav lehet a prolin kivételével. A humán glikoproteinek megközelítőleg 75%-a tartalmaz legalább egy ilyen kötőhelyet, ami az N-glikozilációt a legdominánsabb glikozilációs típussá teszi [1, 27].

Az N-glikánokat alapvetően öt monoszacharid határozza meg (1. ábra A):  $\beta$ -N-acetil-glükózamin (GlcNAc),  $\alpha$ -D-mannóz (Man),  $\beta$ -D-galaktóz (Gal),  $\alpha$ -L-fukóz (Fuc), és  $\alpha$ -N-acetil-neuraminsav (Neu5Ac). A Neu5Ac a leggyakoribb szialsav, ezért a szakirodalomban gyakran egyszerűen „szialsavként” említik. Az N-glikánok egyik legfontosabb sajátossága, hogy konzervált magstruktúrával rendelkeznek, amely minden N-glikán esetében azonos felépítést mutat:  $\text{Man}(\alpha 1-6)\text{-Man}(\alpha 1-3)\text{-Man}(\beta 1-4)\text{-GlcNAc}(\beta 1-4)\text{-GlcNAc}(\beta)\text{-Asn}$ . Ez a stabil, egységes magstruktúra szolgál alapul a további monoszacharid egységek kapcsolódásához, és lehetővé teszi az N-glikánok strukturált, jól összehasonlítható osztályozását. A konzervált magrégióra épülő változatos oldallánc-mintázatok eredményeként az N-glikánok három fő csoportba sorolhatók: magas mannóztartalmú, hibrid és komplex glikánok (1. ábra B). Mivel a magstruktúra állandó, az egyes glikánosztályok közötti különbségek elsősorban az elágazottság, a terminális cukoregységek jelenléte és aránya alapján írhatók le (1. ábra C):

- A magas mannóztartalmú glikánokban a maghoz kizárólag mannóz egységek kapcsolódnak (M4-től M9-típusok, ahol az „M” betű a mannóz jelenlétét, a mellette szereplő szám pedig az adott szerkezetben található mannóz egységek számát jelöli).
- A hibrid glikánokban a mag-egység  $\text{Man}(\alpha 1-6)$  elágazásán megmarad a magas mannóz tartalmú szerkezet, míg a  $\text{Man}(\alpha 1-3)$  ágon komplex típushoz hasonló további GlcNAc, a Gal, a Neu5Ac vagy Fuc egységek is kötődnek.
- A komplex glikánok szerkezeti sokféleséget mutatnak, antennás és biszektilált szerkezetek (mono-, di-, tri-, tetraantennás) formájában.



**1. ábra:** A humán N-glikánokra jellemző monoszacharid-összetétel (A) és glikán típusok, a magas mannóztartalmú, hibrid és komplex szerkezetek példáival (B), valamint a komplex glikánok jellemző módosulásainak (pl. fukoziláció, biszekció, antennaritás, galaktoziláció, szializáció, sziallsav,-és mannóz-kar specifikus kötések) szemléltetése (C).

### 2.2.1. Komplex N-glikánok

A komplex szerkezetű N-glikán típusok felelnek a sejt glikomjának makroheterogenitásáért. Ezek a nagy szerkezeti variabilitást mutató glikánok alapvetően meghatározzák a fehérjék biológiai funkcióját, sejtfelszíni elismerését és az immunválasz finomhangolását. Az 1. ábrán bemutatott főbb glikozilációs típusokat az alábbiak szerint ismertetem.

**Antennaritás és biszektiláció:** a komplex N-glikánok magrégiójához további GlcNAc egységek kapcsolódnak, amelyek kialakítják az úgynevezett antennás szerkezetet. Ez lehet mono-, di-, tri- vagy tetraantennás elágazás. Monoantennás glikánok esetében különösen fontos a magstruktúrában található  $\alpha$ 1,6- és  $\alpha$ 1,3-kötésű mannóz-karok szerkezete, mivel ennek alapján kétféle izomer különíthető el. A biszektiláció egy további

specifikus jellemzője a komplex N-glikánoknak. Ebben a struktúrában egy további GlcNAc egység  $\beta$ 1,4-kötésen keresztül kapcsolódik a központi mannózhoz.

**Terminális összetétel:** a komplexitás kiterjed az oligoszacharid láncvégi, azaz terminális szénhidrát összetételre is. Ha a nem-redukáló (terminális) végen galaktóz található, a glikánt galaktoziláltnak, míg szíálsav esetén szializáltnak nevezzük. A terminális galaktóz miatt ezek az oligoszacharidok fiziológiás pH-n nem hordoznak elektromos töltést, ezért neutrális glikánoknak nevezik. Ezzel szemben a terminális szíálsav jelenléte negatív töltést eredményez, mivel a szíálsav karboxil-csoportja savas jellegű és disszociált állapotban van. A szíálsav mennyisége és térállása ( $\alpha$ 2,3,- vagy  $\alpha$ 2,6-specifikus kötés) önmagában is tovább növeli komplex N-glikánok variabilitását [28].

**Fukoziláció:** a komplex N-glikánok esetében gyakran fordul elő a fukoziláció is. Ez azt jelenti, hogy egy fukóz egység a magrégió GlcNAc komponenséhez kapcsolódik, ezeket a struktúrákat mag-fukozilált glikánoknak nevezzük. Ritkább esetekben antenna-fukoziláció is előfordulhat, amely a nem-redukáló végi elágazásokhoz kötődő fukóz jelenlétére utal.

Összességében az N-glikánok kapcsolódási módjai ( $\alpha/\beta$  térállás, a glikozidos-kötés például  $\alpha$ 1,2, - $\beta$ 1,4-típusai) rendkívül sok izoformát hoznak létre.

### 2.3. Az N-glikánok nomenklaturája

Az 1970-es évekig a glikánszerkezeteket a standard IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) rendszer alapján nevezték el. A ma alkalmazott szimbólumrendszert az *Essentials of Glycobiology* könyv szerkesztői egységesítették, majd SNFG (Symbol Nomenclature for Glycans) néven szabványosították [29-31]. Az SNFG rendszer különböző színű és formájú geometriai alakzatokkal ábrázolja az egyes monoszacharidokat, ezzel támogatva a glikánok gyors felismerését és összehasonlítását. Például a kék négyzet a GlcNAc, a zöld kör a Man, a sárga kör a Gal, a lila rombusz vagy csillag a Neu5Ac, a piros háromszög a Fuc cukrokat jelenti. Ez a vizuális rendszer, mára nemcsak a szakirodalomban, hanem adatbázisokban (pl. GlyTouCan, UniCarbKB, GlycoWorkBench) és szoftverekben is széles körben használt [32-34].

A szimbólumrendszer mellett fontos az egységes szöveges nomenklatura is. Napjainkban, a legszélesebb körben az oxfordi nomenklaturát alkalmazzák, amit Harvey és munkatársai vezettek be, amely már szerkezeti jellemzőket is kifejez: elágazás (A), galaktóz (G), szíálsav (S), mag-fukóz (F), biszektilált GlcNAc (B), mannóz (M). Például az FA2G2 jelölés fukozilált, diantennás és két terminális galaktózt tartalmazó cukor az oxfordi jelölés szerint [30]. Az alábbiakban az Oxford-jelöléseket alkalmazom az N-glikánstruktúrák

bemutatására, melyek az antennaritás, galaktoziláció, szializáció, biszektiláció és fukoziláció mértékét és jellegét jelölik.

**-Magstruktúra:**

- A2 – két antennás, afukozilált
- FA2 – két antennás, fukozilált
- A2(6) –  $\alpha$ 1,6-kötésű mannóz-kar
- A2(3) –  $\alpha$ 1,3-kötésű mannóz-kar

**-Antennaritás:**

- A1-A4 – az antennák számát jelöli: mono (A1)-, bi (A2)-, tri (A3)- és tetra (A4)-antennás szerkezetek

**-Galaktoziláció:**

- G1-G4 – a terminálisan elhelyezkedő galaktózok számát jelöli
- A1G1, A2G1 – monogalaktozilált
- A2G2 – digalaktozilált
- A3G3 – trigalaktozilált
- A4G4 – tetragalaktozilált forma

**-Biszektiláció:**

- B – a biszektilált struktúrát jelöli, ahol a GlcNAc a mag  $\beta$ -mannózához kapcsolódik  $\beta$ 1,4-glikozidos kötéssel keresztül
- A2B – magszerkezet biszektilációja
- A2BG1 – biszektilált és monogalaktozilált
- A2BG2 – biszektilált és digalaktozilált

**-Szializáció:**

- S – szialsavak számát jelöli
- A1G1S1, A2G1S1, A2G2S1 – monoszializáltak
- A2G2S2, A3G3S2, A4G4S2 – diszizializáltak
- A3G3S3, A4G4S3 – triszializáltak
- A4G4S4 – tetraszializáltak

**-Fukoziláció:**

- F – a fukóz jelenlétét jelöli a struktúrákban, például a fentebb bemutatott struktúrák fukozilált formáinak jelölései: FA2, FA1, FA3, FA4, FA1G1, FA2G1, GA2G2, FA3G3, FA4G4, FA2B, FA2BG1, FA2BG2, FA1G1S1, FA2G1S1, FA2G2S1, FA2G2S2, FA3G3S2, FA4G4S2, FA3G3S3, FA4G4S3, FA4G4S4

## 2.4. Az N-glikoziláció szerepe egészséges és beteg állapotokban

Az N-glikánok szerkezete és összetétele egészséges állapotban is jelentős egyéni, valamint sejttípus-specifikus variabilitást mutat, amelyet számos biológiai tényező befolyásol, csakhogy mint az életkor, a nem és egyéb környezeti hatások [35-38]. Az

alpmintázatok ismerete nélkülözhetetlen a kóros körülmények között - például krónikus vagy akut gyulladásban, illetve vírusfertőzések során - bekövetkező változások megértéséhez [26]. Az alábbi alpontok az egészséges állapotra jellemző glikozilációs mintázatokat, valamint a különböző gyulladásos és fertőzőes betegségekből megfigyelt főbb N-glikozilációs mintázatot mutatja be. Ezek összefoglalását az 1. táblázat tartalmazza.

#### **2.4.1. Egészséges, normál állapot**

Az N-glikozilációs változások gyulladásos betegségekből vagy más kóros állapotokban csak akkor érthetők meg, ha először az egészséges állapot jellemzőit térképezzük fel. Az egészséges, azaz a sejt normál állapotában a humán vér glikoproteinjeinek mintázatában gyakoriak a mag-fukozilált komplex N-glikánok, különösen az IgG, haptoglobin és más máj eredetű fehérjék esetében. Ennek oka, hogy a bioszintézisben részt vevő enzimek sejtspecifikusak, így a májsejtekben magas a mag-fukozilációért felelős FUT8 enzim expressziós szintje, míg az immunsejtekben inkább az antenna-fukozilációért felelős FUT7 enzim dominál [39, 40]. A szérumban domináló di- és triantennás, galaktozilált és szializált komplex N-glikánok kialakulását elsősorban az elágazást létrehozó N-acetil-glükózamin-transzferázok (MGAT1, MGAT2, MGAT5), valamint a terminális módosításokat végző galaktozil- és szialiltranszferázok (B4GALT1, ST6GAL1) expressziós mintázata és aktivitása határozza meg [20, 41-43].

Mivel a glikánmintázatokat számos egyéni faktor is befolyásolja, mint az életkor vagy a nem erősen befolyásolja, így Gordan Lauc és munkatársai részletesen feltérképezték a humán vér N-glikozilációs profilját különböző életkorú csoportokban [44, 45]. Eredményeik szerint az agalaktozilált glikánok és a biszektilált GlcNAc-t tartalmazó glikoformák mennyisége nő az életkor előrehaladtával, míg a mag-fukozilált glikánok aránya csökken [41, 46]. Továbbá nők esetében az ösztrogén és más hormonok szintjének csökkenése (pl. menopauza idején) megváltoztatja a glikoziltranszferázok aktivitását, így módosul az agalaktozilált (G0) és szializált (S) struktúrák aránya [38].

#### **2.4.2. Krónikus gyulladásos betegségek**

A krónikus gyulladás hosszan fennálló, alacsony vagy közepes intenzitású immunválasz, amely tartós szövetkárosodással és az immunrendszer folyamatos aktivációjával jár. Krónikus gyulladásos betegségekből - például a rheumatoid arthritis (RA) [47, 48], gyulladásos bélbetegségben (IBD) [19], vagy autoimmun hepatitisben (AIH) [49] - a glikozilációs mintázat jelentősen megváltozik. A teljes vér glikoprofiljában

általánosan megfigyelhető, hogy csökken a galaktoziláció és szializáció, miközben nő a biszektilált GlcNAc tartalom. Gyakori továbbá a fukoziláció mértékének változása is [41, 46].

#### Sclerosis multiplex (SM)

Az RA és AIH mellett a sclerosis multiplex (SM) szintén autoimmun eredetű betegség, amely neurodegeneratív folyamatokat okoz a mielinhüvely elleni kóros immunválasz révén [17]. A cerebrospinális folyadékból (CSF) származó IgG vizsgálataiban, Wuhler és társai a biszektilált GlcNAc emelkedését, valamint a galaktoziláció és fukoziláció csökkenését mutatták ki a SM betegekben. Ezeket a változásokat a CSF eredetű IgG pro-inflammatorikus jellemzőjeként értékelték. Decker cikke szintén kiemelte, hogy a galaktoziláció csökkenése összefügg a betegség progressziójával [50, 51]. Ez a sajátos glikánmintázat, a CSF-re specifikus IgG (oligoklonális IgG) jelenlétével együtt egyedi immunválaszt feltételez az SM betegségben [52]. Ana Cvetko és munkatársai 2020-ban a plazmafehérjék és a plazma eredetű IgG N- glikozilációját vizsgálták folyadékkromatográfiával és fluoreszcens detektálással. A plazma glikoproteinek esetében hangsúlyozták az antennáris fukoziláció, valamint a tri-és tetraantennás galaktoziláció jelentőségét. A vizsgálatot kiegészítették a plazmaeredetű IgG csökkent mag-fukóz tartalmú glikoformáinak azonosításával. Összességében a plazma komplex glikoformáinak aránya nőtt, míg az IgG afukozilációja fokozódott az egészséges kontrollhoz képest [53]. Egy másik kutatás a szérum- és a CSF eredetű IgG-t hasonlította össze. Eredményeik szerint a szérumból származó IgG magasabb szializáltsággal és galaktoziláltsággal rendelkezik, mint a CSF eredetű IgG [54].

#### **2.4.3. Akut gyulladásos betegségek**

Az akut gyulladás a szervezet gyors válaszreakciója fertőzésre, szövetkárosodásra vagy más károsító ingerekre, mely során poszttranszlációs és szerkezeti változások mennek végbe a vérplazma fehérjeiben. Akut gyulladás során számos szérum glikoprotein - például az immunoglobulinok, a haptoglobin és az akut fázisfehérjék (pl.  $\alpha$ 1-antitripszin) - glikozilációja is módosul [55-57]. A teljes szérum N-glikánmintázatban akut gyulladás esetén fokozódik a galaktoziláció és szializáció [55]. Az akut fázisfehérjék – amelyekre főképp a több antennával rendelkező glikánok jellemzőek - ilyenkor még komplexebb, több elágazást tartalmazó szerkezeteket alakítanak ki [56]. Ezek a változások közvetlenül befolyásolják a fehérjék immunmoduláló funkcióit. Az agalaktozilált IgG glikánok pro- inflammatorikus hatásúak, azaz fokozzák a gyulladásos választ. Ezzel szemben a

sziálsavban gazdag, teljesen galaktozilált vagy biszektilált struktúrák gyakran anti- inflammatorikus, gyulladáscsökkentő jelleget mutatnak. Az elmúlt években számos vizsgálat foglalkozott az akut gyulladásos folyamatok során megfigyelhető N-glikozilációs változásokkal, többek között bakteriális tüdőgyulladás, vírusos COVID-19 fertőzés, valamint hasi műtéket követő szisztémás gyulladás esetén [21, 58, 59].

### COVID-19

A vírusos fertőzések során az immunrendszer gyors és összetett válaszreakciót indít el, amely jelentős változást okozhat a szervezet glikozilációs mintázataiban. A 2019-ben megjelent súlyos akut légzőszervi szindrómát okozó koronavírus-2 (Sars-CoV-2 vagy COVID-19) világiárványa emberek millióit érintette és a legtöbb országban több fertőzési hullámban zajlott le [60]. A COVID-19-et a súlyos akut légúti szindrómát okozó koronavírus 2 (SARS-CoV-2) okozza, amely az angiotenzin-konvertáló enzim 2 (ACE2) receptoron keresztül jut be az emberi sejtekbe [61]. A járvány megfékezésének egyik legfontosabb stratégiája a SARS-CoV-2 vírus elleni védőoltások alkalmazása volt. Ennek köszönhetően csökkent a fertőzések időtartama, és a pozitív esetek száma is [62]. Az elsőként jóváhagyott immunizációs eljárások az mRNS-alapú vakcinák voltak, amelyek a koronavírus tüskefehérjéje ellen termeltek antitesteket. Számos tanulmány vizsgálta hogyan változott a N-glikoziláció a COVID-19 hatására [21, 63-65]. Elemezték a teljes szérum és plazma glikánmintázatát [21, 66, 67], a szérum eredetű IgG-t [68, 69], valamint a tüskefehérje- specifikus IgG-t is [64, 65]. Bladergroen és munkatársai kimutatták, hogy a COVID-19 betegek teljes szérumában nőtt a tri- és tetraantennás, különösen  $\alpha$ 2,6-kötésű szializált glikánok aránya. Ezzel párhuzamosan a biszektilált, mag-fukozilált szerkezetek és az oligomannózok aránya csökkent, főként a súlyos esetekben [21]. Hasonló eredményekről számoltak be más tanulmányok is: emelkedett di-szializáció, valamint oligomannóz-tartalom mellett csökkent aszializációt (A2G2 struktúrák) figyeltek meg a COVID-19 betegekben. Ezek a változások az akut fázisú fehérjék és a gyulladásos válasz glikozilációs eltéréseihez köthetők [63].

Habár a COVID-19 kapcsán több N-glikozilációs változást leírtak, az oltási státusz önálló, teljes szérumra gyakorolt hatása kevésbé feltárt. Ennek vizsgálata különösen fontos lehet a napjainkban folyó immunológiai vizsgálatok szempontjából. A széles körű átoltottság és a vírusokkal való többszöri találkozás együttesen formálhatják az immunválasz glikozilációs mintázatait. Ezért ezeknek a tényezőknek a különválasztása új megértést adhat a betegség és az oltás hatásairól.

### Egyéb akut gyulladásos folyamatok

Akut gyulladásos állapotok során a szervezet gyors és szisztémás választ ad a károsító ingerekre, amelynek egyik jellemzője az akut fázisfehérjék fokozott termelődése. Ezek a fehérjék - haptoglobin, az  $\alpha$ 1-savanyú glikoprotein és az  $\alpha$ 1-antitripszin - N- glikozilált fehérjék, amelyek szerkezeti jellemzői érzékenyen reagálnak a gyulladásos állapotra [56, 70]. Számos vizsgálat igazolta, hogy akut gyulladás során ezen fehérjék N- glikozilációs mintázata megváltozik, és ezek a változások eltérnek a krónikus gyulladásos állapotokban megfigyelhető mintázatoktól. Például az  $\alpha$ 1-savanyú glikoprotein esetében akut gyulladás hatására megnő a diantennás N-glikánok aránya, míg krónikus betegségekben ez a jelenség nem jellemző [71]. Az  $\alpha$ 1-antitripszin esetében az akut gyulladás súlyosságával párhuzamosan emelkedik a szializált N-glikánok aránya [56]. Az akut gyulladás N-glikozilációs hatásait rendszerszinten is vizsgálták. Egy 2016-os vizsgálatban a klinikai hasi műtéteket követően kialakuló szisztémás gyulladás során elemezték a teljes plazma N-glikánmintázat időbeni változásait. A vizsgálat során 12, 24 és 48 órával a beavatkozást emelkedett a szializáció, különösképpen a mag-fukozilált tri-és tetraszializált glikánok esetében, míg csökkent a mag-fukozilált diantennás glikánok mennyisége [59].

A jelenleg alkalmazott diagnosztikai módszerek gyakran nem elégségesek az alhasi fájdalom pontos okának elkülönítésére. A vakbélgyulladás egy olyan akut, progresszív gyulladásos folyamat, amely perforációhoz vezethet, ezért sebészi beavatkozást igényel. Ugyanakkor számos esetben - különösen gyermekpopulációban - a nem specifikus klinikai tünetek és a diagnosztikai bizonytalanság együttesen indokolatlan appendectomiához (vakbél eltávolítására irányuló specifikus műtéti folyamat) vezetnek. Az N-glikozilációs mintázatokon alapuló biomarker-kutatás ezért időszerű és kiemelt jelentőségű, mivel hozzájárulhat a vakbélgyulladás megbízhatóbb felismeréséhez és a differenciáldiagnosztika javításához.



**1. táblázat:** Az egészséges állapotra jellemző N-glikozilációs mintázatok, valamint a különböző gyulladásos és fertőzőes betegségekben megfigyelt és szakirodalomban leírt módosulások ismertetése.

| Patológiai állapot         |                     | Jellemző glikánmintázat                                                                                                       | Specifikusság                                    |
|----------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Egészséges (normál)</b> |                     | mag-fukozilált komplex glikánok                                                                                               | máj eredetű fehérjék [41]                        |
|                            |                     | di- és triantennás komplex glikánok galaktóz és szialsav dominanciával                                                        | szérum glikoproteinek általános jellemzője [16]  |
|                            |                     | $\alpha$ 2,6-szialsavas kötésű izoformák                                                                                      | $\alpha$ 1-antitripszin jellemző glikoforma [20] |
| <b>Krónikus gyulladás</b>  | általánosan         | agalaktoziláció, aszializáció, biszektilált GlcNAc emelkedett szintje                                                         | szérum és IgG glikoprofilban egyaránt [46]       |
|                            | sclerosis multiplex | agalaktoziláció, biszektilált GlcNAc, afukoziláció fokozódása                                                                 | CSF IgG [50, 51]                                 |
|                            |                     | antenna fukoziláció, tri- és tetraantennás galaktoziláció- és szializáció fokozódása                                          | plazma fehérjék [53]                             |
|                            |                     | afukoziláció, szializáció és monogalaktoziláció emelkedése                                                                    | plazma IgG [53, 54]                              |
| <b>Akut gyulladás</b>      | általánosan         | multiantennaritás                                                                                                             | akut fázisfehérjék [57]                          |
|                            |                     | A2F glikánokon fokozott szializáció és galaktoziláció                                                                         | szérum fehérjék [72]                             |
|                            |                     | fokozott diantennaritás                                                                                                       | $\alpha$ 1-savanyú glikoprotein [71]             |
|                            |                     | emelkedett szializáció                                                                                                        | $\alpha$ 1-antitripszin [56]                     |
|                            | hasi műtét után     | mag-fukozilált tri- és tetraszializáció fokozódása és mag-fukozilált diantennaritás csökkenése                                | plazma fehérjék [59]                             |
|                            | COVID-19            | tri- és tetraantennás, $\alpha$ 2,6-szializált glikánok emelkedése és biszektiláció, aszializáció és oligomannózok csökkenése | plazma fehérjék [21, 63]                         |

## 2.5. Az N-glikoziláció analitikai vizsgálatainak kihívásai

A glikomikai kutatások szorosan kapcsolódnak az új generációs, automatizált mintaelőkészítési eljárásokhoz, valamint a nagy áteresztőképességű (high-throughput, HTP) analitikai technológiák fejlődéséhez [73]. Az 2. ábra összefoglalja a napjainkban alkalmazott legfontosabb HTP glikoanalitikai módszereket. Ezek közül a leggyakoribb a folyadékkromatográfia (LC), a tömegspektrometria (MS), a kapilláris elektroforézis (CE), illetve ezek különböző kombinációi. Előnyük, hogy gyorsak, robusztusak és nagy

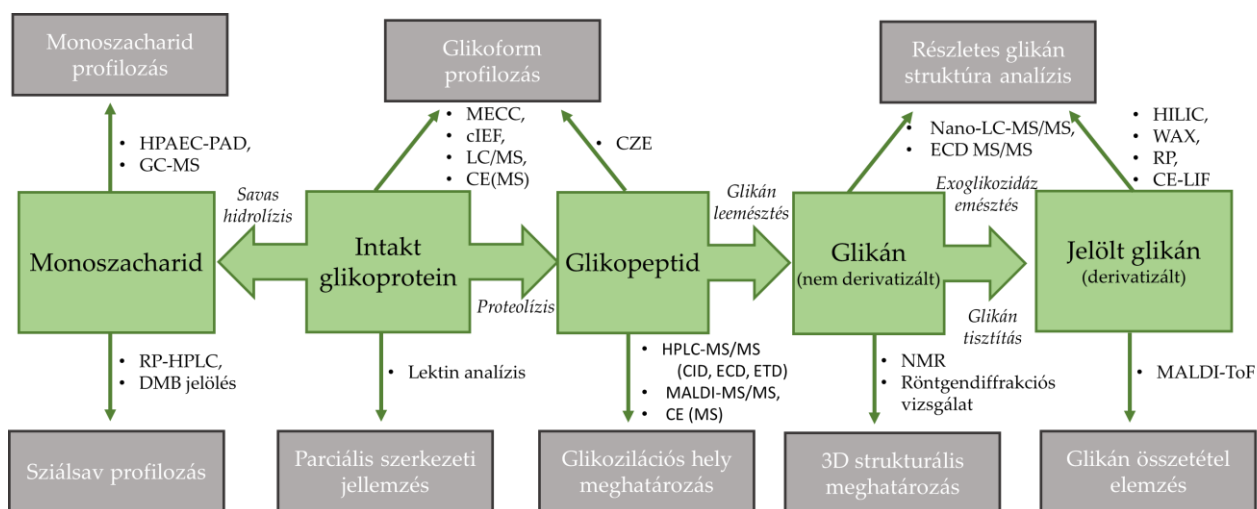
felbontású, akár szerkezet-specifikus információt is nyújtanak a glikokonjugátumokról. Ezek a módszerek kombinálhatók szabványosított, automatizált munkafolyamatokkal, valamint integrált szoftverplatformokkal, amelyek statisztikai feldolgozást is lehetővé tesznek, figyelembe véve a biológiai variabilitást (pl. nem, életkor, gyulladásos vagy egyéb klinikai paraméterek) [28].

A legtöbb technika kétdimenziós (2D) adatot generál, ahol az intenzitás a retenció idő vagy a tömeg/töltés arány ( $m/z$ ) függvényében ábrázolható. Ezek a 2D profilok támogatják a glikán-adatbázisok használatát és a nagymintás statisztikai összehasonlítást. A természetes glikánok azonban gyakran alacsony koncentrációban fordulnak elő, és kémiai tulajdonságaik (kis méret, nagy polaritás, töltéshiány) miatt nehezen detektálhatók hagyományos analitikai eszközökkel. A gyenge jelintenzitás és a nem kielégítő ionizációs hatékonyság jelentősen rontja a kvantifikálhatóságot és az összehasonlíthatóságot, különösen LC-MS és MS vizsgálatok esetén.

A megbízhatóság növelése érdekében előkészítő lépésekre van szükség, például derivatizálásra. A derivatizálás olyan kémiai módosítás, amely során a kiindulási molekula egy származéka képződik. Gyakran alkalmazott módszer a fluoreszcens vagy permetilezéses derivatizálás [8, 74]. Ez a detektálhatóság fokozását, az ionizációs hatékonyság javítását, a jel/zaj arány növelését, valamint az izoformák elkülönítését szolgálja. A fluoreszcens származékképzés során a glikánok redukáló végén fluoreszcens festék, például 2-aminobenzamid (2-AB) vagy prokainamid (ProA) kapcsolódik a glikán GlcNAc egységén keresztül, úgynevezett redukatív aminálási folyamaton keresztül [75].

A glikoziláció vizsgálatára számos stratégia áll rendelkezésre, a választás mindig a kutatási kérdéstől függ. A főbb módszerek:

- **Intakt glikoprotein analízis:** a teljes fehérje és glikoziláció vizsgálata, amely átfogó információt ad a glikoformák és más poszttranszlációs módosítások kapcsolatáról, de nem különíti el az O-és N-glikozilációt, sem a glikoziláció aminosav szekvenciáját [76, 77].
- **Glikoprotein elemzés:** tripszines enzimatis hasítással peptidek vizsgálata lehetővé teszi a glikozilációs helyek szerinti elemzést [78, 79].
- **Felszabadított N-glikánok analízise:** PNGase F enzimmel felszabadított glikánok szerkezeti vizsgálata derivatizálást követően. LC-MS esetén fluoreszcens címkézés szükséges, MS/MALDI esetén más derivatizálási módszerek is alkalmazhatók, például etil-észterifikáció [7, 8].



**2. ábra:** A glikán molekulák karakterizálásának lehetséges útvonalai és módszerei Karin Marino áttekintése alapján [7]. Rövidítések a „Mellékletek - Rövidítések jegyzékében” lettek feltüntetve.

### 2.5.1. HILIC-alapú fluoreszcens glikánanalízis áttekintése

A hidrofil kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfia (HILIC) az elmúlt évek során az N-glikozilációra irányuló folyadékkromatográfiai mérések egyik vezető szereplőjévé vált. A HILIC alapú módszer megfelelő a vízdékonny, poláros oligoszacharidok, különösen azok szerkezeti izomerjeinek elválasztására. A komplex glikánok esetében a mannózkarokon megjelenő  $\alpha$ 1,6- és  $\alpha$ 1,3-glikozidos kötésű izomerek elkülönítése más módszerekkel nehéz lenne. A HILIC módszerben a retenció a glikánok hidrofil tulajdonságain alapul, amelyeket a méret, a töltés, az elágazások száma és a monoszacharid-összetétel határoz meg. Az alacsony pKa-jú mozgófázis (jellemzően magas acetonitril tartalmú oldószer) elősegíti a finom glikánszerkezeti különbségek szerinti elválasztást. A savas közeg protonált állapotban tartja a savas funkciók csoportokat, ezáltal csökkenti az ionizációból származó másodlagos kölcsönhatásokat [80, 81]. A fluoreszcens kromatogramokon a glikoformák hidrofilitás szerint eluálódnak az oszlopról: a kevésbé poláros (pl. neutrális - FA2, A2G2) glikánok rövidebb retenciós idővel, míg a polárosabb (pl. sziálsavat tartalmazó - A2G2S1, FA3G3S3) struktúrák hosszabb retenciós idővel jellemezhetők.

Az új generációs UPLC / UHPLC rendszerekben (Ultra Performance Liquid Chromatography / Ultra High Performance Liquid Chromatography) a HILIC oszlopok kialakítása jelentősen növeli a kromatográfiai hatékonyságot. Például a 2  $\mu$ m alatti részecsketöltéssel rendelkező állófázisok olyan finom eltérések elkülönítését is lehetővé

teszik, mint a biszektilált N-acetil-glükózamin és annak analógja [82-84]. Ez különösen fontos klinikai szempontból, mivel a biszektilált GlcNAc egységgel rendelkező glikoproteinek kimutathatóan csökkentik a daganatos áttétképződést [80].

Ahogy az korábban már említésre került, a szénhidrátok ionizációja természetes formájukban gyenge, mivel nem tartalmaznak UV-elnyelő (kromofór) vagy fluoreszcens (fluorofór) csoportokat. Ezért a fluoreszcens jelölés kulcsfontosságú a nagy érzékenységgű detektáláshoz, különösen HILIC-FLD-MS mérésekben. A klasszikusan alkalmazott jelölőszer a 2-AB alkalmazása, amely sztöchiometrikusan 1:1 arányban kapcsolódik a glikánok redukáló végével, lehetővé téve a kvantitatív relatív mennyiségi analízist. Hátránya azonban az alacsony ionizációs hatékonyság, amely korlátozza az electrospray ionizációs (ESI-MS) érzékenységet [85]. Egy újabb generációs jelölőanyag, például a ProA, bázikus tercier amin oldalláncokat tartalmaz, ami fokozza a cukrok a protonaffinitását, ezáltal pedig jelentősen fokozza az ESI-MS módszer érzékenységét [7]. A ProA ugyanazon redukatív aminálási mechanizmus mentén kapcsolódik a glikánokhoz, mint a 2-AB, viszont nagyobb fluoreszcenciát és fokozott MS jelintenzitást biztosít. Az irodalmi adatok alapján még a HILIC-LC elválasztásban is különbséget mutat: míg a 2-AB jelölés esetén a FA2G2 és A2BG2 glikánok koelúciót mutattak, ProA alkalmazásával jól szétválaszthatók [85].

A HILIC-alapú mintaelőkészítési módszerek az elmúlt években jelentős fejlesztéseken mentek keresztül. A mintaelőkészítés során a tisztítás nélkülözhetetlen, mivel eltávolítja az N-glikán felszabadítása és jelölése után visszamaradt fehérjéket, sókat és felesleges jelölőmolekulákat, amelyek rontanák a mérés pontosságát, zavarhatnák a detektálást, vagy csúcseltolódást okoznának a kromatogramon. A korábban alkalmazott, időigényes vákuum-centrifugálási és HPLC-alapú tisztítási lépések helyett ma már gyors, nagy áteresztőképességű szilárd fázisú extrakció (SPE) alapú protokollok állnak rendelkezésre [85-87]. A megfelelően optimalizált tisztítási lépés biztosítja a glikánok kvantitatív visszanyerését, és lehetővé teszi a minták közvetlen injektálását HILIC- UHPLC- FLD- MS rendszerekbe. Ennek következtében az utóbbi években egyre nagyobb figyelem irányul az alternatív, glikán-specifikus izolálási technikák fejlesztésére, különösen a szilárd fázisú extrakción alapuló módszerekre [87]. Ilyen megközelítések közé tartozik például a hidrofíli interakción alapuló szűrőhegyek alkalmazása [88], a mágneses gyöngy-alapú [11], valamint az NH<sub>2</sub>-funkcionalizált vagyis, amin-csoporttal módosított mágneses nanorészecskével történő tisztítás [89].

## 2.6. A mágneses nanorészecskék jellemzése és funkciói

A mágneses nanorészecskék (MNP) olyan nanoszkopikus méretű részecskék (általában 1-100 nm közötti átmérővel), amelyek ferri- vagy ferromágneses tulajdonsággal rendelkeznek, és jellemzően vas-oxid alapú anyagokból (magnetit vagy maghemit) állnak. Amikor a nanorészecskét külső mágneses térbe helyezzük, nettó mágneses momentum indukálódik benne. Ilyenkor a nanorészecske atomjai már nem véletlenszerűen orientálódnak, így az egyes atomok párhuzamosan rendeződnek a mágneses térrel és egy nem nulla eredő momentumot eredményeznek. A mágneses anyagokban az atomok mágneses momentuma kis térfogatokba, úgynevezett doménekbe rendeződik. Nagyobb részecskék több domént tartalmaznak, amelyek egymás mágneses hatását részben kioltják. A részecskék méretének csökkenésével a többdoménes szerkezet egydoménessé válik, ami energetikailag kedvezőbb, mert megszűnik a doménfalak energiája. További méretcsökkenéssel a hőmozgás képes az egész részecske mágneses momentumát megfordítani, így külső tér hiányában is a nettó mágneses momentum nulla marad. Ezt a jelenséget szuperparamágneses tulajdonságnak nevezzük [90, 91].

A nanorészecskék vizes közegben karboxil- vagy más ionizálódó csoportok révén, negatív felületi töltéssel rendelkeznek. Ez elektrosztatikusan taszítást eredményez a részecskék között, megakadályozva az aggregációt, és elősegítve a stabil, homogén diszperzió kialakulását. Hidrofil természetük lehetővé teszi, hogy hidrogénkötéseken vagy dipól-dipól kölcsönhatásokon keresztül más hidrofil molekulákkal is kölcsönhatásba lépjenek, amelyek a felületi adszorpció jelenségeként értelmezhetők. Az adszorpció lehetővé teszi a molekulák MNP felületén való visszatartását, azaz oldatokból való célmolekula izolálásának lehetőségét [92, 93].

A nanorészecskék poláris jellege növeli a nedvesíthetőséget – a vízmolekulák könnyen szétterülnek a nanorészecske felszínén – ami szintén hozzájárul a jó vízbeli diszpergálhatósághoz [94]. A különböző ferrit alapú nanorészecskéket gyakran vonják be biokompatibilis polimerekkel, például dextránnal, polivinil-alkohollal (PVA) vagy polietilén-glikollal (PEG). Ezek a bevonatok növelik a részecskék kolloid stabilitását, csökkentik és a biokompatibilitás növelése érdekében [95, 96].

### 2.6.1. Mágneses nanorészecskék orvosi alkalmazásai

A MNP-k az 1980-as évektől kezdve széles körben alkalmazást nyertek az orvostudomány számos területén. A diagnosztikai képalkotásban például az FDA (Egyesült

Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala) által engedélyezett vas-oxid-alapú nanorészecskéket használnak MRI kontrasztanyagként, illetve a képminőség javítására szolgáló anyagként (MPI-magnetic-particle imaging) is [97, 98]. A mágneses nanorészecskék egyik legnagyobb előnye a nagy fajlagos felület mellett az, hogy a felszínük szabadon és sokoldalúan módosítható. Különböző kémiai funkciós csoportokkal, (pl. hidroxil-, aldehid- vagy amin-csoport) kémiaiilag módosítva alkalmassá tehetők fehérjék, nukleinsavak, sejtek vagy cukrok szelektív izolálására komplex biológiai mintákból [99, 100]. Irodalmi példák között szerepel:

- genomi dezoxiribonukleinsav (DNS) izolálása növényi sejtekből [101],
- DNS kinyerése humán vérből vas-oxid alapú nanorészecskével [102],
- bakteriális plazmid DNS izolálás mangán-ferrit nanorészecskék segítségével [92],
- fehérje izolálásra [94],
- vérérszám eredetű glikánok megkötése mágneses gyöngy alapú technológiával [11, 89],
- glikopeptidek szelektív elválasztása a nem glikopeptidektől NH<sub>2</sub>-funkcionalizált mágneses nanorészecskékkel [103].

Egy 2021-ben megjelent tanulmány szerint az NH<sub>2</sub>-funkcionalizált, ferrit-alapú mágneses nanorészecskék alkalmazása a glikoproteomikai minták előkészítésében különösen előnyös lehet [103]. Az ilyen típusú részecskék nemcsak hidrofíll kölcsönhatások révén képesek a glikopeptidekhez vagy glikánokhoz kötődni, hanem további elektrosztatikus kölcsönhatást is kialakítanak a cukormolekulák negatív töltésű csoportjaival. Ennek köszönhetően a szialinsavat tartalmazó glikopeptidek és glikánok erősebben adszorbeálódhatnak a részecskék felszínén, mivel a szialinsav karboxilcsoportja kölcsönhatásba lép az MNP felületén lévő NH<sub>2</sub>-csoportokkal. Összességében az NH<sub>2</sub>- funkcionális MNP-felületek nemcsak fokozott szelektivitást biztosítanak, hanem lehetővé teszik a gyors mágneses szeparálást és a 96-lyukú lemezekkel való kompatibilitást is, ami ígéretes lehet automatizálható glikán-tisztítási eljárások fejlesztéséhez.

### 3. Célkitűzések

A PhD disszertációmban bemutatott kutatás elsődleges célja, egy mágneses nanorészecske alapú, költséghatékony és automatizálható glikán tisztítási protokoll kidolgozása, amely alkalmas szérumból származó fehérjék N-glikozilációs mintázatának vizsgálatára. A kutatásom további célja volt, hogy három különböző patológiai körülmény alatt fennálló gyulladásos betegség teljes szérum eredetű N-glikozilációs mintázatának a feltérképezése. Mindez az alábbi pontok célkitűzéseit jelentette:

1. **Újonnan szintetizált NH<sub>2</sub>-funkcionalizált MNP-alapú glikán tisztítási módszer fejlesztése:** Négyféle NH<sub>2</sub>-funkcionalizált, különböző ferrit-alapú nanorészecske N- glikánok felületi adszorpcióján alapuló megkötési hatékonyságának tesztelése UHPLC rendszerben, a legrobustusabb MNP kiválasztása céljából.
2. **MNP-platform optimalizálása költséghatékonyság és automatizálhatóság szempontjából:** A leghatékonyabb NH<sub>2</sub>-funkcionalizált ferrit-alapú MNP kiválasztása, majd annak glikán megkötés szempontjából történő optimalizálása. A diszperziós közeg, az MNP koncentráció és az elúciós pufferek tesztelése. Az optimalizált MNP-protokoll összevetése kereskedelmi forgalomban kapható glikántisztítási módszerrel glikánkötési és költséghatékonysági szempontból. Végül a módszer integrálása egy automatizálható platformra.
3. **Három gyulladásos betegség – sclerosis multiplex, COVID-19, gyermekkori akut vakbélgyulladás – N-glikozilációs mintázatának vizsgálata:** Teljes szérum alapú glikánprofil meghatározása az adott betegségben. Glikánmintázatok összehasonlítása a betegséggel diagnosztizált és velük nemben és korban megegyező egészséges kontroll mintacsoportok között, statisztikai tesztek alátámasztásával.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Felhasznált anyagok

#### 4.1.1. NH<sub>2</sub>-funkcionalizált ferrit alapú mágneses nanorészecskék előállításához

- nikkell(II)-nitrát hexahidrát, nátrium-acetát (Thermo Fisher Scientific, Kandel, Németország)
- mangán(II)-nitrát tetrahydrát (Carl Roth, Karlsruhe, Németország)
- kobalt(II)-nitrát hexahidrát, vas(II)-nitrát nonahidrát (VWR International, Leuven, Belgium)
- magnézium(II)-nitrát hexahidrát, etanolamin, etilén-glikol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

#### 4.1.2. N-glikán mintaelőkészítéshez és LC-MS elemzéshez

- PNGase F enzim készlet (Asparia Glycomics, San Sebastián, Spanyolország)
- Borán-2-metilpiridin komplex (<sup>1</sup>kat. szám: 654213), prokainamid-hidroklorid (kat. szám: P9879) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- DMSO (kat. szám: 85190) (Thermo Fisher Scientific, Kandel, Németország)
- Ecetsav ≥99%, LC-MS minősített (kat. szám: 84874.180), Formiát sav 99%, LC-MS minősített (kat. szám: 84865.180), Acetonitril ≥99.9%, HiPerSolv CHROMANORM® LC-MS minősített (kat. szám: 83640.320), 2-propanol ≥99.9%, HiPerSolv CHROMANORM®, LC-MS minősített (kat. szám: 84881.29) (VWR International, Leuven, Belgium)
- 25 (v/v)%-os Ammónia oldat (kat. szám: AM02580100), (Scharlab S.L., Barcelona, Spanyolország)
- humán szérum minták az aláírt vagy tájékoztatott beleegyezési nyilatkozat mellé mellett, a Helsinkai Nyilatkozat előírásainak megfelelően kerültek gyűjtésre. A tanulmányt a Regionális Kutatásetikai Bizottság jóváhagyta (Etikai engedély számok: sclerosis multiplex (RKEB/IKEB-G-102-102-2018), COVID-19 (BORS-02-2021), gyermekkori akut vakbélgyulladás (BORS-02/2023) (Borsod-Abaúj-Zemplén Vármegyei Központi Kórház és Egyetemi Oktatókórház, Neurológiai, -Gyermekebészeti-és Infektológiai Osztályai, Miskolc, Magyarország)

---

<sup>1</sup> kat. szám: katalógus szám



## 4.2. NH<sub>2</sub>-funkcionalizált ferrit alapú mágneses nanorészecskék előállítása

A kísérleteimben négyféle NH<sub>2</sub>-funkcionalizált ferrit alapú MNP-t állítottunk elő a Miskolci Egyetem Anyag-és Vegyészmérnöki Kar Kémia Intézetben Dr. Vanyorek László témavezetése alatt Ilosvai Mária Ágnes PhD társammal. Az előállítási módszer egy koprecipitációs eljárás alapul, melynek lépéseit az alábbiakban ismertetem :

1. 50 ml etilén-glikolban feloldottunk 8,08 g (2 mmol) vas(III)-nitrát nonahidrátot és a kívánt fémkomponens (kobalt (Co), nikkelt (Ni), mangán (Mn) vagy magnézium (Mg)) kristályvizes formájával elegyítettünk.
2. 12,3 g nátrium-acetátot oldottunk 100 ml etilén-glikolban, amely 150 mmol mennyiségnek, azaz 1,5 M koncentrációnak felel meg. Az elkészített oldatot fűtőkosárban, mágneses keverőt alkalmazva állandó keverés mellett, 100 °C-on, 15 percig kevertettük.
3. A feloldódott fém sók (Co,- Ni,- Mn,- Mg-fém sók) oldatát hozzáöntöttük a glikol-alapú nátrium-acetát oldathoz és további 30 percig kevertettük.
4. Az oldathoz 35 ml etanol-amint adtunk és 200 °C-ra fűtve a rendszert 12 órán keresztül refluxáltattuk a keveréket.
5. Lehűtöttük az oldatot, majd centrifugálással (4200 rpm, 10 perc) elválasztottuk a fém só-alapú szilárd fázist.
6. A visszanyert szilárd fázist különböző módon használtuk fel a továbbiakban annak érdekében, hogy az MNP-re nézve eltérő kiindulási állapotú oldatokat hozzunk létre (pl. szárított forma visszadiszpergálása Milli-Q vízben, glikolos közegben hagyva az MNP oldatot, glikolos oldat kimosása vízzel, majd annak hígítása):

6.1. A kinyert szilárd fázist desztillált vízzel néhányszor átmostuk, amíg a mágneses ferrit könnyen el nem vált egy mágnes segítségével a vizes fázistól. Végül a kinyert mágneses ferritet átöblítettük abszolút etanollal és 70 °C-on, 12 órán keresztül szárítottuk. A kísérleteim kezdetén tesztelt CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, MgFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> és NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> MNP típusok szárítással készültek. Az így kinyert NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> MNP-t az erre irányuló kísérletekben szárított MNP-nek (Sz jelölés) neveztem el. A szárítást követően meghatároztam az MNP tömegét, majd ezeket az értékeket alapul véve vízben 5 mg/ml koncentrációjú törzsoldatokat készítettem.

A további alpontokat csak a  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  MNP esetében végeztem el, hogy optimalizáljam az MNP-hez tartozó protokollt.<sup>2</sup>

6.2. Ebben a pontban leírt lépéseket csak a  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  MNP esetében végeztem el. A 12 órás refluxátatást követően a glikolos közegből nem mostam ki az MNP-t, hanem azt, ebben az oldatban használtam a kísérletekben a további hígításokhoz. A felhasználás tesztelésénél glikolos MNP-nek (G jelölés) neveztem ezeket a mintákat. A glikolos oldatban diszpergált MNP koncentrációját nem tudtam közvetlenül meghatározni, mivel a magas forráspontú, erősen viszkózus oldószer nem távolítható el maradéktalanul a szilárd fázisról hagyományos szárítási módszerekkel. Emiatt a kiindulási törzsoldat koncentrációját 100×-osnak tekintettem, és ebből különböző arányú hígításokat készítve vizsgáltam a glikán-specifikus kötés hatékonyságát (4.1. Eredmények alpontban ismertetem részletesen).

6.3. Az alábbi lépéseket szintén csak a  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  MNP esetében végeztem el. A kinyert szilárd fázist hasonlóan az előző pontban leírtakhoz, desztillált vízzel mostam át, amíg a szilárd mágneses ferrit könnyen el nem vált a vizes fázistól. Ezt követően az MNP-t nem szárítottam ki, hanem az eredeti vizes közegben oldva alkalmaztam a kísérletekben, amit vizes MNP-nek (V jelölés) neveztem el. A  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  MNP (V) koncentrációját úgy határoztam meg, hogy 3 mintát készítettem, 1-1 ml mintát óraüvegre cseppentettem, majd azt 12 órán keresztül szárítószekrényben hagytam. A szárított  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  MNP (V) minták tömegét analitikai pontosságú mérlegen mértem, majd a három párhuzamos minta eredményét átlagolva visszaszámoltam az ennek megfelelő oldattérfogatot. Ez alapján a vizes diszperzió koncentrációját 37 mg/ml-nek határoztam meg, amelyet a további kísérletekben törzsoldatként használtam, és ebből készítettem a szükséges hígításokat.

#### 4.3. Az N-glikán-analízis mintaelőkészítési lépései

A glikoproteinek folyadékkromatográfiával történő analitikai vizsgálatának előkészülete magába foglalja a cukrok fehérjékről történő leválasztását, majd fluorofór csoport hiánya miatti fluoreszcens módon való jelölését és végül a cukormolekulák izolálásának folyamatát (N-glikán tisztítás) a lizátumban visszamaradt sóktól, fehérjéktől és a felesleges festékmolekuláktól. A mintaelőkészítés folyamatának lépéseit az alábbi alpontokban ismertetem.

---

<sup>2</sup> A 6.2. és 6.3. alpontokban leírtakat önállóan végeztem.

#### 4.3.1. Szérumfehérjék és IgG denaturálása, glikánok enzimatis felszabadítása

A 9  $\mu$ l szérum mintát 65 °C-on, 15 percig denaturáltam 10 $\times$  hígítási koncentrációban alkalmazva az Asparia PNGase F készlethez [104] tartozó denaturáló puffer hozzáadásával, így az emésztési közeg végtérfogata 10  $\mu$ l volt. A denaturáció során a szérumban található fehérjék másodlagos és harmadlagos szerkezete felbomlik, ezáltal a glikán oldalláncok hozzáférhetővé válnak a következő lépésben alkalmazott enzim számára. Mivel ez a lépés magas hőmérsékleten, 65 °C-on történik, a reakciót követően 10 percet vártam a minta szobahőmérsékletre való visszahűléséhez. Ennek oka, hogy az ezt követő enzimatis reakció a megfelelő hőmérsékleti tartományban mehessen végbe, és a visszamaradt hőhatás ne okozza az enzim denaturációját vagy aktivitásának csökkenését. Ezt követően 20  $\mu$ l térfogatra növeltem az emésztési közeget 7  $\mu$ l Milli-Q víz és 2  $\mu$ l 10 $\times$  PNGase F enzim puffer, végezetül pedig 1  $\mu$ l PNGase F enzim hozzáadásával. Az összeállított elegyet 37 °C-on, egy éjszakán keresztül (O/N) hagytam inkubálódni.

#### 4.3.2. Felszabadított glikánok fluoreszcens derivatizálása 300 mM ProA-val

Következő lépésként a cukrok jelölésére fluoreszcensen detektálható 2-ProA jelölőt készítettem, mely redukzív aminálással kapcsolódik a glikánokhoz. A kutatócsoportunk korábbi tanulmányában összehasonlításra kerülő fluoreszcens jelölők közül (2-aminobenzamid, 2-antranilsav és 2-ProA) a 2-ProA biztosította a nagyobb retenciót és a jobb szeparációt a glikán analízise során HILIC-LC-MS rendszerben [75]. A 300 mM ProA jelölő oldat készítéséhez 300 mM prokainamid-HCl és 300 mM pikolin-borán szilárd anyagot oldottam fel 70/30 (v/v)% DMSO/ecetsav közegben, majd mintánként 10  $\mu$ l jelölő oldat hozzáadásával 3,5 órán keresztül 65 °C-on inkubáltam fehérjéről lehasított glikánokat tartalmazó mintákat, a megfelelő fluoreszcens derivatizáció elérése érdekében.

#### 4.3.3. N-glikánok tisztítási módszerei

Mivel a fluoreszcens festéket proporcionálisan feleslegben alkalmaztam a derivatizálás során így a glikán mintákat tisztítottam az analitikai mérések előtt. A tisztítási lépés során eltávolításra kerülnek a szérummintából visszamaradó fehérjekomponensek - beleértve a PNGase F enzimet is - valamint a pufferekből származó sók, mivel ezek jelenléte kedvezőtlenül befolyásolhatja mind a kromatográfiás elválasztás hatékonyságát, mind a tömegspektrometriás detektálás érzékenységét és pontosságát. A 300 mM koncentrációjú fluoreszcens jelölőoldattal történő derivatizációt követően a reakciót 170  $\mu$ l 100 (v/v)%-os ACN hozzáadásával állítottam le, amivel a glikán minták végső térfogata 200  $\mu$ l-re nőtt.

Ezáltal a glikán minta környezete az acetonitrilre nézve 85 (v/v)%-sá vált, amely ideális polaritási közeget biztosít a tisztítás során a glikán adszorpciós felületen való megkötés lépéséhez. A glikán tisztítási módszerekben alkalmazott pufferek és oldatok pontos elkészítésének receptjét az 1. számú melléklet 2. táblázata tartalmazza. A glikánok tisztítását két különböző,  $\text{NH}_2$ -funkciós csoporton alapuló módszerrel végeztem el.

#### A, N-glikán tisztítás $\text{NH}_2$ -funkcionalizált mágneses nanorészecskékkel

A protokoll minden esetben azonos lépéseket végrehajtva került alkalmazásra, függetlenül attól, hogy az adott MNP-oldat milyen típusú ferrit-alapú mágneses nanorészecskét vagy diszpergáló közeget tartalmazott. A tisztítási lépések a következők voltak, amit grafikusán az 3. ábra mutat be.

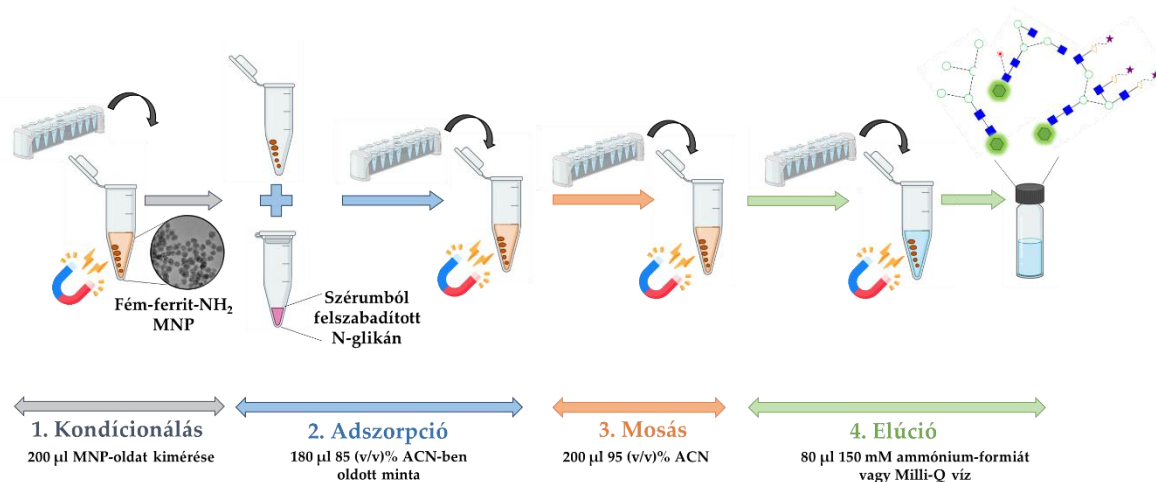
1. Kondicionálás: 1,5 ml-es Eppendorf-csővekben egységesen 200  $\mu\text{l}$  MNP-oldatot pipettáztam, majd mágneses állványra helyezve a csöveket, 1 perces inkubációs időt követően eltávolítottam a felülúszót.

2. Adszorpció: A glikán minták MNP felületén való megkötődéséhez, az emésztett és fluoreszcensen derivatizált minták felülúszóját (180  $\mu\text{l}$  85 (v/v)% ACN-ben oldott glikán minta) összeszuszpendáltam a 1,5 ml Eppendorf-csőben lévő mágneses nanorészecskével és 5 perc inkubációs időt követően ráhelyeztem a mágneses állványra. A mágneses állványon további 1 perces inkubációs időt tartottam, majd eltávolítottam a felülúszót, vagyis a mágnes által leválasztott MNP felett maradó folyadékfázist, és tiszta Eppendorf-csővekbe helyeztem. Fontos megemlíteni, hogy a kísérletek során véletlenszerűen kiválasztottam három tárolt „felülúszó” frakciót, amelyeket HILIC-UHPLC rendszerben elemeztem annak érdekében, hogy megfigyelhető-e bennük glikánjel. A mérések alapján azonban glikánokra utaló jel nem volt kimutatható, ami alátámasztja, hogy a glikánok hatékonyan megkötődtek az MNP felületén.

3. Mosás: A nanorészecskék felületére aspecifikusan kötődő molekulák lemosására 200  $\mu\text{l}$  95 (v/v)%-os ACN oldatot pipettáztam a nanorészecskékre. Az Eppendorf csöveket mágneses állványra helyeztem, majd 1 perces inkubációs idő leteltével eltávolítottam a felülúszót.

4. Elúció: A mosást követően 80  $\mu\text{l}$  elúciós puffert pipettáztam a mintákra, majd összeszuszpendáltam az MNP-vel és 5 percig hagytam inkubálódni szobahőmérsékleten. Az elúciós puffer Milli-Q víz vagy 150 mM ammónium-formiát puffer volt, amit az Eredmények részben az optimalizálás során részletesebben bemutatok. Az inkubáció alatt a poláros ammónium-formiát puffer leszorítja a glikánokat az MNP felületéről, így azok

deszorbeálódnak. Ezt követően a csöveket mágneses állványra helyeztem és további 1 percet követően átmértem a felülúszót egy tiszta 1,5 ml Eppendorf-csőbe, amit eluátumnak neveztem el.



**3. ábra:** Mágneses nanorészecskével történő glikán tisztítás folyamatábrája. 1. Kondicionálás: MNP-oldat kimérése, 2. Adszorpció: szérumból felszabadított N-glikán minta MNP felületén történő megkötődése, 3. Mosás: 95 (v/v)%-os ACN oldattal történő aspecifikus molekulák eltávolítása, 4. Elúció: adott elúciós pufferben glikánok deszorpciója az MNP felületéről.

#### B, N-glikán tisztítás $\text{NH}_2$ - és $\text{CH}_3\text{CONH}_2$ -funkcionalizált MonoSpin oszlopos készletekkel

Az aminnal ( $\text{NH}_2$ ) vagy acetamiddal ( $\text{CH}_3\text{CONH}_2$ ) funkcionizált MonoSpin oszlopos készletek (GL Sciences Inc., Tokió, Japán) kereskedelmi forgalomban kapható termékek [105]. Mindkét típusú készlet egyenletes eloszlású szilícium-dioxid monolitos póruval ellátott, centrifugális oszlop, amire aminopropil egységen keresztül  $\text{NH}_2$ -vagy  $\text{CH}_3\text{CONH}_2$ -funkciós csoportokat kapcsoltak. Ezt a kétfajta készletet alkalmaztam egyrészt a saját MNP-alapú glikán tisztítási protokoll összehasonlításához. Továbbá az  $\text{NH}_2$ - funkcionizált oszlopos készletet a COVID-19 és az akut vakbélgyulladás teljes szérum N- glikozilációs vizsgálatok során.

Az oszlop egy hidrofíl-kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfiai eljárás (HILIC), mely alkalmas cukrok és más hidrofíl vegyületek koncentráálásához. A funkciós-csoporttal ellátott MonoSpin oszlopos készletre épülő tisztítási folyamat négy fő lépése szintén a kondicionálás, adszorpció, mosás és elúció. A MonoSpin oszlopot egy gyűjtő 1,5 ml Eppendorf-csőbe helyeztem, majd ezt alkalmaztam minden lépésnél, kivéve az elúciót, amihez tiszta 1,5 ml Eppendorf csövet készítettem elő. Az oszlopos glikán tisztítási

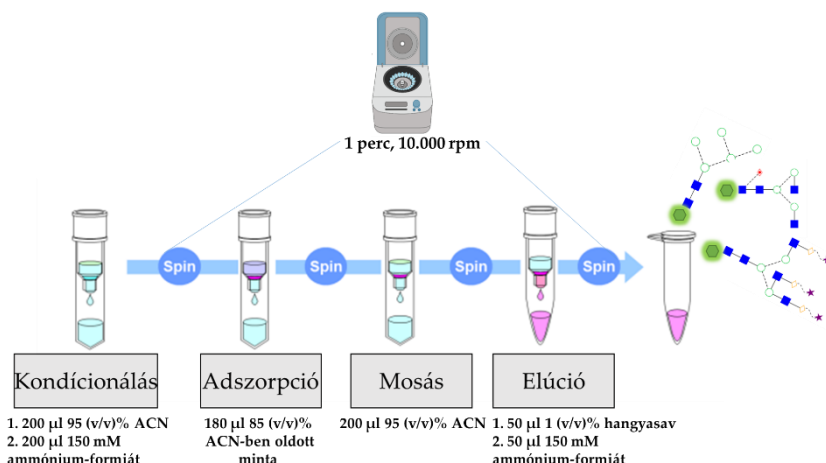
módszer gyártói protokollt követve, az alábbi lépéseket tartalmazza, amit a 4. ábra grafikusán is bemutat:

1. Kondicionálás: 200  $\mu$ l mosó puffert, ami 95 (v/v)%-os ACN oldat, mértem az  $\text{CH}_3\text{CONH}_2$ -vagy  $\text{NH}_2$ -funkcionalizált MonoSpin oszlopra, majd centrifugáltam (1 perc, 10000 rpm). Átfolyót kidobtam a gyűjtő Eppendorf-csőből. A kondicionálás második lépéseként 200  $\mu$ l elúciós pufferként alkalmazott 150 mM ammónium-formiát puffert mértem az oszlopra, majd centrifugáltam (1 perc, 10000 rpm) és az átfolyót szintén kidobtam.

2. Adszorpció: A 180  $\mu$ l 85 (v/v)%-os ACN-ben oldott mintát az oszlopra mértem, majd 5 percig hagytam inkubálódni szobahőmérsékleten, hogy a glikánok megfelelően adszorbeáljanak az oszlopra kötött funkciós csoportokkal. Ezt követően centrifugáltam (1 perc, 10000 rpm), majd az átfolyó frakciót eltettem egy tiszta Eppendorf-csőbe. Ez a frakció minden olyan komponenst tartalmazott, amely nem kötődött az oszlop felületéhez. Hasonlóan az 5.3.3. A alpontban leírtakhoz, itt is ellenőriztem kísérletenként három mintának az adszorpciót követő átfolyó frakcióban van-e glikán jelenlétére utaló fluoreszcens jel. A mérések alapján azonban nem volt detektálható glikánból származó jel, ami arra utal, hogy a glikánok teljes mértékben megkötődtek az oszlopon.

3. Mosás: 200  $\mu$ l mosó puffert (95 (v/v)%-os ACN) mértem az oszlopra, majd centrifugáltam (1 perc, 10000 rpm) és eltávolítottam a felülúszót. Ezt követően az oszlopot tiszta 1,5 ml Eppendorf-csőbe helyeztem.

4. Elúció: A glikán molekulákat két lépésben eluáltam a funkcionális MonoSpin oszlopokról. Először 50  $\mu$ l 1 (v/v)%-os hangyasav oldatot (elúciós puffer1) mértem az oszlopra, 3 percig inkubáltam, majd centrifugáltam. Második lépésben 50  $\mu$ l 150 mM ammónium-formiát puffert (elúciós puffer2) alkalmaztam, szintén az oszlopra pipettáztam, majd 3 percet hagytam inkubálódni, hogy a glikán molekulák teljesen deszorbeálódjanak az oszlopról. Ezt követően centrifugáltam (1 perc, 10000 rpm), majd az átfolyót eluátumként eltettem a glikán HILIC-UHPLC-MS analízishez.



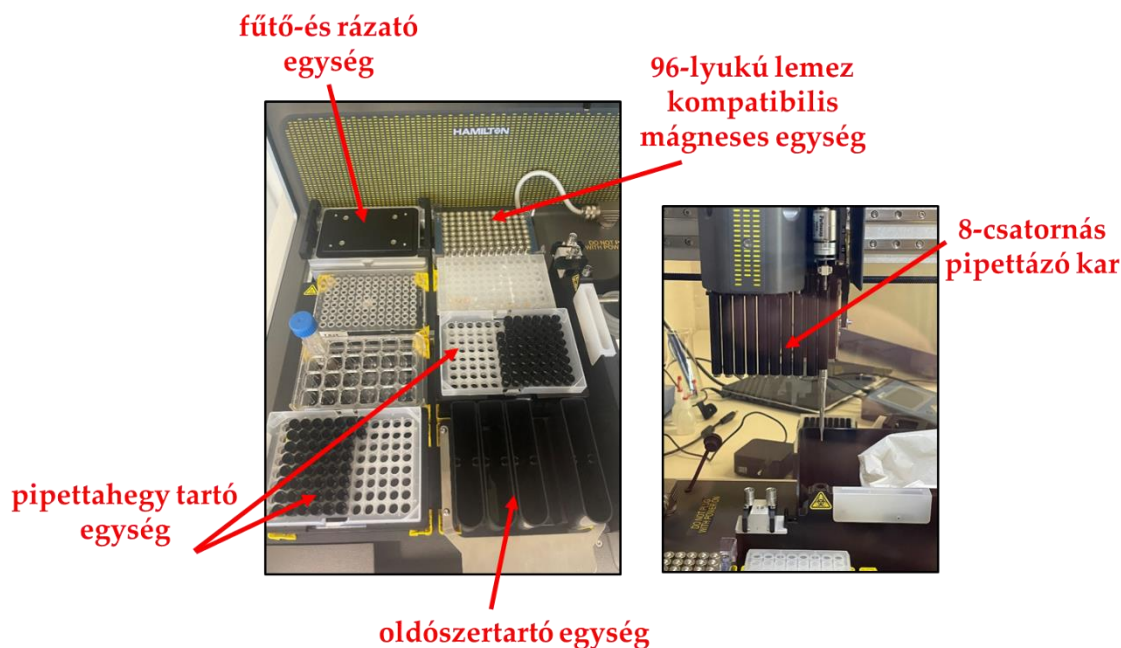
**4. ábra:**  $\text{NH}_2$ -vagy  $\text{CH}_3\text{CONH}_2$ -funkcionalizált MonoSpin oszlopos készlettel történő tisztítás lépései: a kereskedő oldalán megtalálható folyamatábra kiegészítésével. 1. Kondicionálás: MonoSpin oszlop aktiválása a tisztítás során alkalmazott mosó és elúciós pufferekkel, 2. Adsorpció: glikán minta adszorpciója az funkciós-csoporttal ellátott oszlop felületén  $\text{NH}_2$ -vagy  $\text{CH}_3\text{CONH}_2$ -funkciós csoportokon keresztül, 3. Mosás: 85 (v/v)%-os ACN oldattal történő aspecifikus molekulák eltávolítása, 4. Elúció: glikánok deszorpciója az oszlopról 1 (v/v)%-os hangyasav -és 150 mM ammónium-formiát pufferek alkalmazásával.

#### 4.3.4. A glikán-tisztítási protokoll automatizálása

Az automatizálás platformja Hamilton Microlab Prep pipettázó robot volt (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Svájc). A platform elrendezését és az applikációk elhelyezését az 5. ábra szemlélteti. Az automatizáláshoz előkészített oldatok és eszközök:

- 96-lyukú Hamilton-specifikus PCR lemez (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Svájc),
- 4 db Greiner 15 ml centrifugacső az oldatok számára:
- 100% ACN,
- MNP-oldat (0,5 mg/ml  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (V)),
- Mosóoldat (95 (v/v)%-os ACN),
- Elúciós puffer (150 mM ammónium-formiát, pH 4,4).

A manuálisan kifejlesztett protokoll lépéseit a Hamilton vezérlőszoftverbe importáltam, és kisebb módosítással illesztettem a robot kapacitásához. A legfontosabb változtatás a MNP-oldat térfogatának 200 µl-ről 180 µl-re való csökkentése volt, mivel a 96- lyukú lemez maximális végtérfogata 200 µl. Ez a változtatás biztosította a megbízható pipettázást és elkerülte a túlcserélésből eredő hibákat.



5. ábra: Hamilton Microlab Prep pipettázó robotikus platform egységeinek ismertetése.

#### 4.4. N-glikán analízis UHPLC-MS rendszerekben

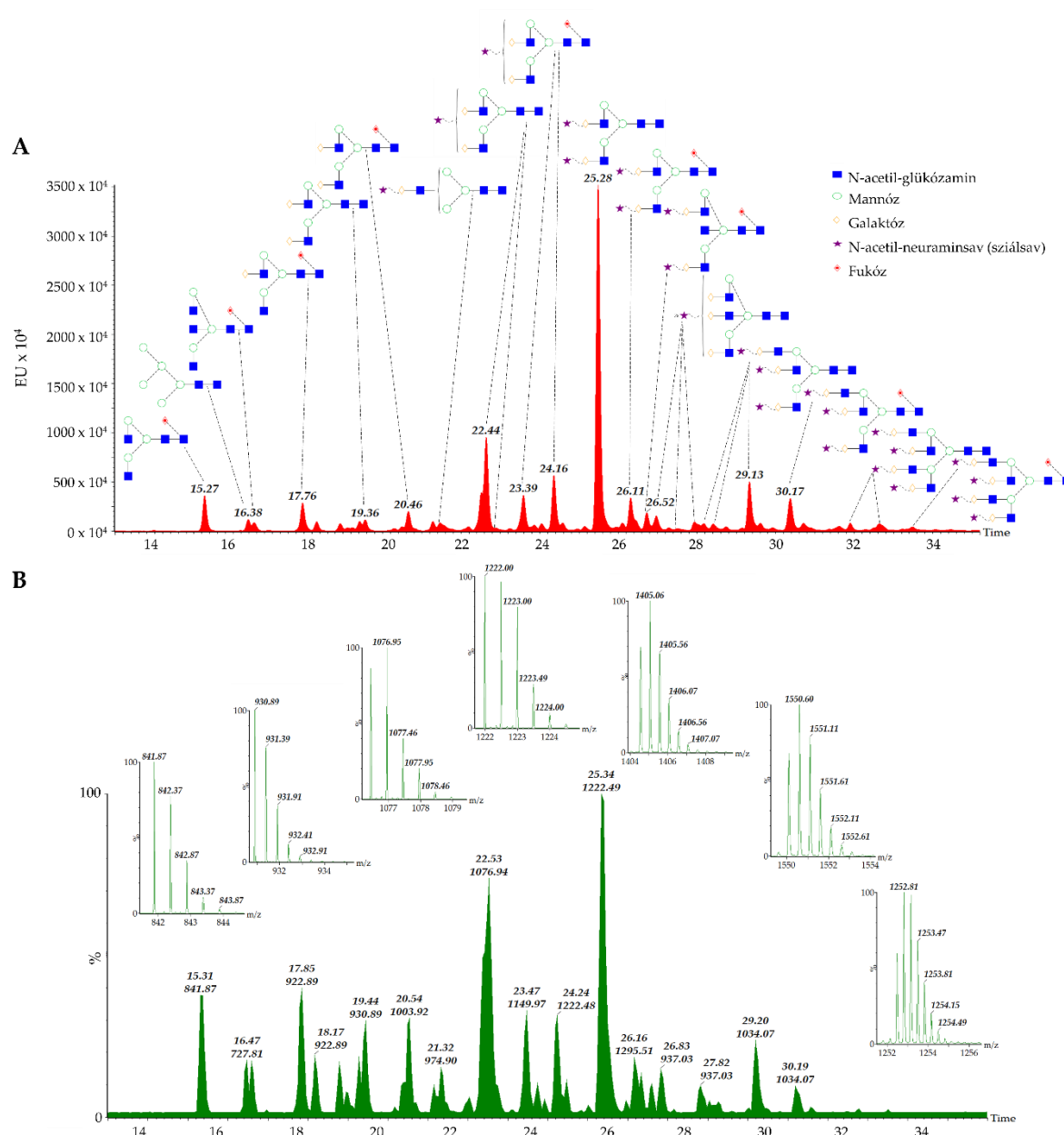
##### 4.4.1. Alkalmazott Waters UHPLC-MS készülékek

Az N-glikán mintákat Waters Acquity UHPLC rendszerrel mértem le mind az MNP alapú glikán-tisztítási protokoll fejlesztésére irányuló kísérletek során, mind a sclerosis multiplex és COVID-19 betegségekhez kapcsolódó teljes szérum N-glikozilációs profiljának feltérképezésekor. A Waters Acquity UHPLC készülék fluoreszcens detektorral és egy Waters SQD típusú tömegspektrométerrel van felszerelve (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA). A Waters SQD egy egyszektoros kvadrupól tömegspektrométer, amely lehetővé teszi a kromatográfiásan elválasztott vegyületek gyors és érzékeny tömegspektrum-alapú detektálását, kiegészítve a fluoreszcens jel detektálását szerkezeti információval. A rendszert az Empower 3 kromatográfiás szoftver vezérelte, amely egy megbízható, moduláris és felhasználóbarát platform a Waters berendezések adatgyűjtésére és feldolgozására. A fluoreszcens kromatogramok kiértékelését az Empower 3 szoftver integrálási algoritmusával végeztem, amelynek során a csúskeresési paramétereket, mint minimum jelintenzitás, jel-zaj arány és csúcsszélességet, előre definiáltam. Az integrálás eredményeként meghatározásra kerültek az egyes csúcsok intenzitásértékei, a csúcs alatti integrált területek, valamint a viszonyított relatív százalékos területarányuk, amely a komponensek relatív abundanciáját (RA%) reprezentálja. Az Empower 3 képes egyszerre



több detektor (pl. UV, FLD, MS) szinkronizált vezérlésére és adatainak összehangolt kiértékelésére, ami különösen hasznos komplex glikánprofilok elemzésekor.

A gyermekkori akut vakbélgyulladás mintaszett, egy Waters Acquity H-class UHPLC készüléken került elemzésre, amely szintén fluoreszcens detektorral van kapcsolva. A 6. ábra A részén bemutatott kromatogram a fluoreszcens detektorral rögzített elválasztási profilt szemlélteti. Továbbá a folyadékkromatográfiás rendszer Waters Xevo-G2-XS QToF (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) tömegspektrométerrel van összekötve. A QToF detektor nagyobb tömegpontosságot, felbontást és szelektivitást biztosít, így pontosabb molekulaazonosítást tesz lehetővé – különösen fontos ez a komplex glikán keverékek esetén, ahol több izomer vagy azonos tömegű, de eltérő szerkezetű komponens fordulhat elő. Továbbá a tömegspektrométer lehetőséget biztosít MS/MS, azaz a fragmentációs spektrumok rögzítésére, amelyek a glikánok részletes szerkezeti meghatározásának elengedhetetlen eszközei (6. ábra B). A rendszert a MassLynx 4.2. verziójú kromatográfiás vezérlőszoftver (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) működteti, amely a Waters QToF és ToF eszközök natív vezérlőszoftvere. A MassLynx lehetővé teszi az LC és MS komponensek részletes beállítását (pl. gradiens program, detektorfeszültségek, ionforrás paraméterek), valós idejű adatgyűjtést és monitorozást, valamint az egyes MS-adatok nyers formátumban (RAW) történő mentését, melyeket később különböző adatfeldolgozó szoftverek képesek kezelni. A méréseket követően az adatok kiértékelését UNIFI szoftverrel (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) végeztem, amely egy integrált adatelemző platform, kifejezetten biomolekulák, például glikánok, peptidek és kis molekulák automatizált analízisére fejlesztve. Az UNIFI lehetőséget nyújt a fluoreszcens kromatogramok automatikus integrálására, azaz kiszámítja a csúcsterületeket és retenciós időket, továbbá a tömegspektrumokat  $m/z$  értékek alapján automatikusan összeveti egy előre definiált glikán adatbázissal, és elvégzi a glikánstruktúrák azonosítását. Fontos kiemelni, hogy az LC és MS jeleket együttesen értelmezi, így egyértelmű kapcsolat hozható létre a fluoreszcens csúcs és a tömegspektrumban detektált ionok között. Az UNIFI szoftverrel végzett adatfeldolgozás során a vakbélgyulladás mintaszett esetében automatizáltan történt mind a fluoreszcens kromatogramok integrálása, mind a glikánstruktúrák  $m/z$  alapú azonosítása. Ez jelentősen csökkentette a kézi adatfeldolgozási időt, és jobb reprodukálhatóságot tett lehetővé.



**6. ábra:** Teljes szérumból származó N-glikánprofil fluoreszcens detektálással (A) és tömegspektrometriás analízissel rögzített eloszlást, valamint a pontos struktúra azonosítást alátámaszt MS/MS (fragmentációs) spektrumot (B) mutatja be.

#### 4.4.2. Kromatográfiás és tömegspektrometriás beállítások és mérési körülmények

A cukormintázat elemzéséhez Waters BEH Glycan Amid típusú oszlopon végeztem, 18-45% gradiens elúciót alkalmazva, ami azt jelentette, hogy az A puffer 50 mM ammónium-formiát (pH 4,4) arányt időben növeltem, így az N-glikánok hidrofilitásuk szerint váltak le az oszlopról. Az elválasztáshoz szükséges paramétereket az oszlop gyártói ajánlások és a vonatkozó szakirodalmi adatok alapján határoztam meg és optimalizáltam, melyeket a 2. táblázat, míg a pufferek előállításának leírását az 1.számú melléklet

2. táblázata tartalmazza [106]. A BEH Glycan Amid oszlop egy, a Waters által fejlesztett hídképzett etil-hibrid, azaz szilícium-szerves hibrid szerkezettel (BEH) kialakított oszlop. A BEH technológia a hagyományos szilícium-dioxid alapú HPLC oszlopok fejlesztett változata. A szilika szemcsék szerkezetébe etil-csoportokat építenek be, amelyek „hidakat” képeznek, így az oszlopban lévő részecskék poláros, hidrofíl vegyületek elválasztására kiválóan alkalmazhatók. A gradiensmódszer célja, hogy megfelelően elkülönítse az eltérő polaritású glikánszerkezeteket; a magas kezdő acetonitril-tartalom segíti a hidrofíl kölcsönhatáson alapuló retenciót, míg a gradiens során fokozatosan növekvő vizes fázis a hidrofilebb glikánstruktúrák eluálását teszi lehetővé, mivel csökkenti azok interakcióját az állófázison található, amid csoportokkal. A 0,4 ml/perc áramlási sebesség az oszlop méretéhez és a tömegspektrométer ionizációs feltételeihez is jól illeszkedik, így optimalizálva a csúcshélességet és a detektálási érzékenységet. A mintákat 75/25 (v/v)%-os ACN és Milli-Q víz oldatában oldottam fel, ami biztosítja a glikánok hatékony retencióját az oszlopon. Minden mérés során 5 µl-t injektáltam, amely optimális térfogatnak bizonyult, elkerülve a csúcsok szélesedését és oszlop mintával való túlterhelését. A mintaadagoló hőmérsékletének az általánosan használt 15 °C-t, míg az oszlop hőmérsékletének 60 °C-t állítottam be minden elemzés során. A magasabb oszlophőmérséklet csökkenti a mozgófázis viszkozitását, javítva az elválasztás hatékonyságát és reprodukálhatóságát, mindamellett, hogy nem rontja a glikán molekuláris szerkezetét. A fluoreszcens detektor gerjesztési és emissziós hullámhosszai 309 nm és 359 nm voltak. A prokainamid fluoreszcens jelölőként való alkalmazása során a molekula gerjesztési maximuma 309 nm-nél, míg emissziós maximuma 359 nm-nél figyelhető meg. Ennek megfelelően a prokainamiddal derivatizált glikánok ezen a hullámhossz-páron nagy érzékenységgel és specifikusan detektálhatók. Az MS-analízis során a kapillárisra 2,2 kV elektropray feszültséget alkalmaztam, mivel ez az érték elegendő a stabil és hatékony ionizációhoz anélkül, hogy túlzott fragmentációt vagy ionelnyomást okozna. Ez a feszültségtartomány továbbá alkalmas volt a pozitív ionizációs módban történő analízishoz, amit 500-2000  $m/z$  tartományban végeztem, adatfüggetlen akvizíciós módban. A deszolvatációs hőmérséklet 120 °C-ra volt beállítva, míg a deszolvatációs gázáramlási sebessége 800 l/óra volt. Ezeket a paramétereket alapbeállításként alkalmaztam a glikán molekulák tömegspektrometriás méréséhez, mivel a viszonylag alacsonyabb hőmérséklet hozzájárul az érzékeny, hőre labilis glikánok integritásának megőrzéséhez, míg a nagy gázáramlás elősegíti a cseppek gyors párologtatását, javítva az ionképződés hatékonyságát és a tömegspektrometriás jel tisztaságát.

**2. táblázat: Waters Acquity UHPLC és MS eszközök beállított paramétereit a mérések során**

| Waters Acquity UHPLC                              |                                                                                      |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Oszlop típus                                      | Waters Glycan BEH Amid (100/150 × 2,1 mm belső átmérő (i.d.), 1,7 µm részecskeméret) |
| A puffer                                          | 50 mM ammónium-formiát oldat (pH 4,4)                                                |
| B puffer                                          | 100 (v/v)% ACN                                                                       |
| Áramlási sebesség                                 | 0,4 ml/perc                                                                          |
| Gradiens                                          | 18-45 (v/v)% az A pufferre nézve                                                     |
| Erős mosó puffer / Gyenge mosó puffer             | 20 (v/v)% ACN / 80 (v/v)% ACN                                                        |
| Injektálási mód                                   | PLNO (részurkos injektálás túltöltéssel)                                             |
| Injektálási térfogat                              | 5 µl                                                                                 |
| Oszlop hőmérséklet                                | 60 °C                                                                                |
| Excitációs / emissziós hullámhossz                | $\lambda_{\text{ex}}=309 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}}=359 \text{ nm}$          |
| Waters SQD és Xevo-G2-XS QToF tömegspektrométerek |                                                                                      |
| Ionizációs mód                                    | pozitív                                                                              |
| $m/z$ tartomány                                   | 500-2000 $m/z$                                                                       |
| Elektrospray feszültség                           | 2,2 kV                                                                               |
| Deszolvatációs hőmérséklet                        | 120 °C                                                                               |
| Gázáram                                           | 800 l/óra                                                                            |

**4.5. Kiértékeléshez alkalmazott szoftverek és statisztikai tesztek**

A mintacsoportok közötti eltérő N-glikozilációs mintázatok feltérképezésére különböző statisztikai teszteket alkalmaztam, mint Shapiro-Wilk normalitásvizsgálat, Kruskal-Wallis teszt, Karakterisztikus Görbe Analízist (ROC analízis), Lineáris Diszkrimináns Analízis (LDA). A vizualizációt IBM SPSS Statistics 25, GraphPad Prism 10.1.2. szoftver és Python 3.10.0 szoftverekben végeztem.

**4.5.1. IBM SPSS Statistics 25**

Az IBM® SPSS® (IBM Corporation, Armonk, New York, USA) egy olyan szoftverplatform, amely számos lehetőséget kínál statisztikai elemzések elvégzéséhez, a gépi tanulási algoritmusok, nyílt forráskódú bővíthetőség és nagy adatok integrációjának terén egyaránt.

**Normalitásvizsgálat**

Az IBM SPSS szoftverben Shapiro-Wilk normalitásvizsgálatokat alkalmaztam, mivel a mintacsoportokon belüli mintaszám minden kísérletben kevesebb volt, mint ötven minta. A Shapiro-Wilk teszt nullhipotézise, hogy a minták követik a normál eloszlást, így az

alacsony  $p < 0,05$  értékek a nem-normális eloszlást jelentik. A teszt jellemzője még az adatok szimmetriájára és csúcosságára való érzékenység.

#### Szignifikáns különbségek keresése

Mivel az adataim nem követték a normál eloszlást, így a mintacsoportok közötti szignifikáns eltérések azonosítására nemparaméteres tesztek alkalmaztam, mint Mann-Whitney U-tesztet (2 mintacsoport összehasonlítása esetén) vagy Kruskal-Wallis tesztet (2-nél több mintacsoport összehasonlítása esetén). A nemparaméteres tesztek alkalmazásánál először 0,05 majd 0,01 szignifikancia szintek ( $p$ -értékek) beállításával is elvégeztem az analízist, ezzel szigorítva a többszörös tesztelés hibalehetőségeit. A teszt elvégzésével a mintacsoportok közötti különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettem, ha a  $p < 0,05$ . A szignifikancia erőssége szerint az eredményeket  $^*(p \leq 0,05)$ ,  $^{**}(p \leq 0,01)$  vagy  $^{***}(p \leq 0,001)$  jelöltem.

#### ROC görbe

A Karakterisztikus Görbe Analízis vagy röviden ROC (Receiver Operating Characteristic) analízist döntéshozó rendszerként alkalmaztam. Ez esetben azt jelenti, hogy a teszt az N-glikán struktúrákat a RA% értékeinek eloszlása alapján határozza be egy adott mintacsoportba, például beteg vagy kontroll, amely a döntés kimenetelét jelenti. A teszt megmutatja a hibázás mértékét is, mivel a ROC görbén az y tengelyen bemutatott szenzitivitás reflektálja a valódi pozitív értékek arányát (TPR), azaz a helyesen azonosított pozitív értékeket. Minél magasabb a TPR aránya, annál megbízhatóbban jellemzi az adott változó a mintacsoportot. Az x tengely mutatja a hamis pozitív értékek arányát (FPR) vagy 1-specifitást értékeket, ami minél alacsonyabb annál kisebb a hibázás mértéke. A döntés kimenetele azt jelenti, hogy a teszt különböző küszöbértékeihez milyen szenzitivitás és 1-specifitás értékek tartoznak. A szenzitivitás és

1-specifitás értékek pontonként ábrázolhatók, amelyek kirajzolják a ROC-görbét [107]. A ROC görbe alatti területet a szoftver integrálja és meghatározza az AUC értékét, amely annak a valószínűségét fejezi ki, hogy egy pozitív minta nagyobb RA%-t ad, mint egy negatív minta. Minél magasabb az AUC értéke annál megbízhatóbb a teszt, például glikomikai-szakirodalomban a 0,85-ös AUC magas diagnosztikai teljesítményt jelez [21]. A tesztben adott aszimptotikus szignifikancia megerősíti, hogy az adott marker valóban képes megkülönböztetni a pozitív és negatív eseteket, tehát ha szignifikáns az eredmény, akkor nem véletlenül jött létre. Valamint az elemzés eredményeként az aszimptotikus alsó-és felső

határ közötti tartomány figyelembevételével lehet következtetni a becslés pontosságára és bizonytalanságára. Ez az intervallum megadja, hogy ha sokszor megismételnénk a vizsgálatot hasonló körülmények között, akkor mekkora tartományban helyezkedhetne el az AUC érték. Ha az alsó határ meghaladja a 0,5 értéket, akkor a teszt pontossága elfogadható.

#### **4.5.2. Past 4.02**

A Past („Paleontological Statistics Software” csomag) 4.02-es verzióját (Oslo Egyetem, Norvégia) alkalmaztam Lineáris Diszkriminációs Analízis (LDA) elvégzésére és ábrázolására. Az LDA egy olyan statisztikai módszer, amely meghatározza a változók - jelen esetben az N-glikánok RA%-os értékei - lineáris kombinációját. Eszerint a tesztben előre definiált mintacsoportok elkülönülése a lehető legnagyobb mértékű lesz. A módszer során meghatározott diszkriminancia függvények mindegyikéhez tartozik egy sajátérték (eigenvektor), amely megmutatja, hogy az adott lineáris kombináció mekkora arányban járul hozzá az adathalmaz teljes szórásához. A sajátértékek arányából számítható az úgynevezett összvariancia megoszlása, amelyet százalékos formában értelmezünk. Például egy 84,80%-os hozzájárulás azt jelzi, hogy a vizsgált elválás döntő többsége már az első kombináció alapján megtörténik. A diszkriminancia függvények mentén ábrázolt minták és változók két- vagy háromdimenziós térben való szemléltetésére szolgál a biplot, amely egy kombinált pont- és vektorábra. A minták (pl. betegek, kontrollok) pontként, míg a változók (pl. egyes glikánstruktúrák) vektorként jelennek meg a tengelyek által meghatározott koordináta-rendszerben. A vektorok iránya és hossza információt ad arról, hogy az adott változó milyen mértékben és milyen irányba járul hozzá a minták elválasztásához.

#### **4.5.3. GraphPad Prism 10.1.2**

A GraphPad Prism szoftver (Insightful Science, San Diego, Kalifornia, USA) számos tudomány területén alkalmazható szoftver statisztikai tesztek elvégzéséhez és informatív, áttekinthető ábrák készítéséhez. A szoftverben ábrázoltam az MNP-k glikánmegkötési hatékonyságának optimalizálási eredményeit; lehetőség volt egyrészt az egyes mintákhoz tartozó adatpontok külön jelölésére, másrészt több glikánhoz tartozó értékek összesített diagramjainak megjelenítésére is.

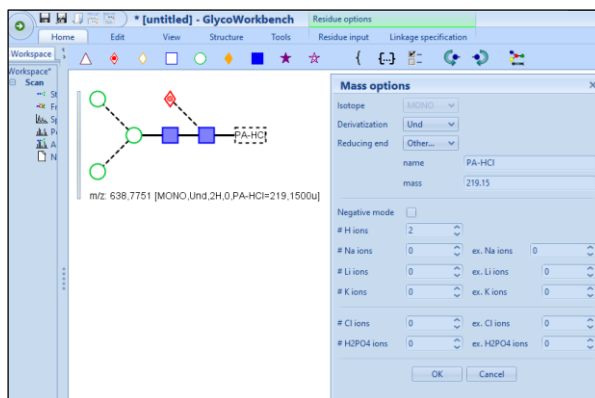
#### **4.5.4. Python 3.10.0**

A gyermekkori akut vakbélgyulladás vizsgálatára irányuló kísérlet eredményeinek kiértékeléséhez és bemutatásához Python (Python Software Foundation (PSF), Delaware,

USA) programozási nyelvet alkalmaztam. amiben Dr. Garami Attila nyújtott segítséget. A szoftverben folytonos változók normalitásának vizsgálatára Shapiro-Wilk tesztet (95%-os konfidenciaszinten) használtunk. Továbbá Spearman- és Point-Biserial korrelációanalízist végeztünk, melynek eredményét hő térképen ábrázoltuk, ahol az egyes glikán csúcsok vakbélgyulladás betegségre gyakorolt hatását pontozási rendszerben mutatjuk be: például 7- nél nagyobb korrelációs együttható értéket erős korrelációnak tekintettük [108]. A paraméterpárok korrelációs együtthatóinak értelmezése  $10^{-1}$ -es skálán történt. Spearman-korrelációt alkalmaztunk a glikánok egymás vagy laborparaméterek közötti korrelációjának vizsgálatára, mivel ez a teszt alkalmazható folytonos változók esetében. Point-Biserial korrelációanalízis pedig alkalmas olyan korrelációk elemzésére, amelyben folytonos változókat hasonlítunk dichotóm, azaz kategoriális változókhoz. A Python szoftvert vizuális ábrázolásra is használtuk, mivel a Kruskal–Wallis-próbával szignifikáns eltérést mutató N- glikán csúcsokat a szoftverben létrehozott pontdiagramok segítségével szemléltettük, ahol a betegség jelenléte vagy hiánya függő változóként került beállításra az esetleges mintázatok szemléltetése céljából.

#### 4.5.5. GlycoWorkBench 2.1

A glikánok tömegspektrometriás (MS) analízise során a szerkezetek azonosítása gyakran manuális, időigényes lépésekből áll. Ennek támogatására jött létre a GlycoWorkbench nevű szoftver, amely összeveti az elméleti tömegeket a spektrumból nyert csúcsokkal, és vizuálisan segíti a legvalószínűbb szerkezeti megfelelések kiválasztását (7. ábra). A szoftver ingyenesen elérhető eszköz, ami segítségével glikánszerkezeteket az azonosított tömegük alapján, a kötések és monoszacharid egységek szerint tudjuk grafikusán ábrázolni [34].



7. ábra: GlycoWorkbench szoftver grafikus felülete (ingyenesen elérhető: <https://glycoworkbench.software.informer.com/2.1/feluletről>).

#### 4.6. SARS-CoV-2 ELISA immunoassay vizsgálat

A szérumminták SARS-CoV-2 ellen termelődött IgG szintjét ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, azaz enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat) módszerrel ellenőriztem. A kísérletben alkalmazott mikrolemez alapú SARS-CoV-2 IgG ELISA készlet, szérum vagy plazma eredetű SARS-CoV-2 IgG antitestek *in vitro* kvalitatív detektálására alkalmas (Autobio Diagnostics CO., LTD., Kína), a felszínre kötött SARS-CoV-2 IgG-re specifikus antigénen keresztül [109]. A módszertípust tekintve ez a készlet kemilumineszcens módon kimutatható két-lépéses indirekt elven működik. Első lépésben a szérummintát, ELISA minta oldattal kevertem össze, ami biztosítja a megfelelő ionerősséget és pH-t a reakció során. Majd második lépésként, enzimmel összekapcsolt antigént tartalmazó oldatot (HRP-konjugátum) adtam a zsebekbe, ami a mintában található SARS-CoV-2 IgG antitesttel komplexet alkot egy immunológiai reakción keresztül és katalizálja a kemilumineszcens szubsztrát reakciót. Ennek eredményeként a közegben abszorbanciát tudunk mérni, ami arányos lesz a mintában lévő SARS-CoV-2 IgG mennyiségével. A reakció összeállítását a protokollban leírtak alapján végeztem el a gyártói utasítások szerint [109]. A kemilumineszcens detektálást 450 nm-en végeztem egy lemezolvasó berendezés használatával a gyártói utasítások alapján (ClarioStar lemez olvasó berendezés; BMG LabTech, Ortenberg, Németország). A készlethez tartozó pozitív standard kontroll minta OD<sub>450</sub> értéken mért abszorbancia [ $A_{450}$ ] értéke alapján határoztam meg a reakció küszöbértékét. Ez a pozitív kontroll átlagos abszorbanciájának a 15%-a volt. Így a tesztben a reaktív vagy pozitív eredmény azt jelenti, hogy a minta abszorbanciája eléri vagy meghaladja a 0,1-et ( $A_{450} \geq 0,1$ ). Ezzel szemben a nem-reaktív vagy negatív eredmény azt jelenti, hogy a minta abszorbanciája 0,1 alatti. ( $A_{450} < 0,1$ ).



## 5. Eredmények

Az eredményeket két fő részre bontottam, mivel a kutatás során az MNP-alapú glikán tisztítási protokoll optimalizálása és a teljes szérum N-glikozilációs vizsgálatok időben párhuzamosan zajlottak. Emiatt az optimalizált MNP-módszer nagy mintaszámú alkalmazására csak a sclerosis multiplexhez kapcsolódó glikozilációs elemzések során került sor. A 5.1. részben az NH<sub>2</sub>-funkcionalizált mágneses nanorészecske alapú glikán tisztítási protokoll fejlesztésének eredményeiről, az optimalizálási lépések szerint alpontra bontva számolok be. Továbbá az 5.2. alrészben a teljes szérum N-glikoziláció feltérképezésének eredményeit ismertetem az általam tanulmányozott háromféle gyulladásos betegségben.

A kísérletekben konzisztensen az N-glikozilációs vizsgálatok során a mintaelőkészítést az N-glikánok felszabadításával kezdtem, amelyet az N-glikán specifikus PNGase F enzimatisz emésztése révén valósítottam meg (4.3.1. alponban leírtak szerint). Ezt követően a felszabadított glikánokat 2-ProA alapú fluoreszcens jelöléssel derivatizáltam (4.3.2. alponban leírtak szerint). Az analitikai mérés előtt, a glikánokat különböző, hidrofíli interakción alapuló tisztítási módszerekkel tisztítottam, ideértve a korábban bemutatott, CH<sub>3</sub>CONH<sub>2</sub>-vagy NH<sub>2</sub>-funkcionalizált centrifugális oszlopokat (4.3.3. B alponban leírtak szerint), valamint az újonnan kidolgozott, NH<sub>2</sub>-funkcionalizált mágneses nanorészecske alapú protokollt (4.3.3. A alponban leírtak szerint). Az N-glikán analízist HILIC- UHPLC- MS rendszeren végeztem el, a 4.4. alponban részletesen bemutatott módszertan alapján.

### 5.1. NH<sub>2</sub>-funkcionalizált MNP-k: összehasonlítás, optimalálás, automatizálás N-glikánok megkötéséhez

Az NH<sub>2</sub>-funkcionalizált MNP protokoll fejlesztése az alábbi lépéseket követve valósult meg:

- különböző ferrit-prekursorok hatása az MNP-k N-glikánmegkötő képességére (5.1.1.),
- diszperziós közeg és az MNP-koncentráció hatása a részecskék stabilitására és a megkötés hatékonyságára (5.1.2.),
- elúciós puffer összetételének szerepe a glikánok kötődési mechanizmusában, valamint MNP-alapú protokoll összevethetősége kereskedelmi forgalomban elérhető NH<sub>2</sub>-funkcionalizált centrifugális oszlopokkal (5.1.3.),
- MNP-alapú protokoll automatizálása szérum N-glikánok megkötésére (5.1.4.).

Az 5.1. alpontban leírt optimalizálási összehasonlításhoz a kromatogramok Empower 3 kromatográfias szoftverben történt integrálásból származó paramétereket vettem figyelembe:

1. Egyrészt a glikán csúcsok fluoreszcens intenzitását vizsgáltam: minél magasabb volt az integrálással meghatározott emissziós érték (EU), annál nagyobb mennyiségű fluoreszcensen jelölt glikán került visszanyerésre a tisztítás során, így annál hatékonyabbnak minősült az adott MNP-típusú módszer.
2. A másik szempontom során a különböző MNP-alapú glikántisztítási protokollok összehasonlítását a módszerek UHPLC-analízisre gyakorolt reprodukálhatósági hatása alapján is elvégeztem. A reprodukálhatóságot a kromatogramokon azonosított glikán csúcsok csúcs alatti területeinek százalékos eloszlásával, azaz az RA% értékeivel jellemeztem. A RA% értékek konzisztenciája arra utalt, hogy a minták glikozilációs összetétele homogén maradt a különböző párhuzamos mérésekben, ezáltal az alkalmazott tisztítási protokoll megbízhatónak tekinthető az analitikai következtetések szempontjából is.

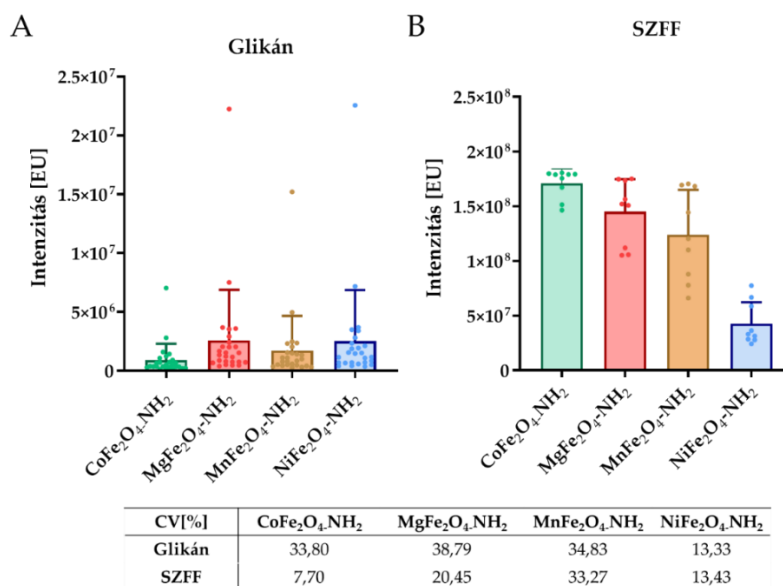
#### **5.1.1. A különböző ferrit prekursorok hatása az N-glikánok megkötési hatékonyságára**

A kísérletek során Co-, Mg-, Mn- és Ni-prekursor alapú MNP-eket alkalmaztam. Az MNP-eket különböző karakterizációs módszerekkel jellemeztük, melyek eredményét az 1. számú melléklet ábrái és táblázatai tartalmazzák. Az NH<sub>2</sub>-funkcionalizált, ferrit alapú MNP-eket N-glikán megkötési hatékonyság és szabad festék (SZFF) eltávolítás szempontjából hasonlítottam össze. Az SZFF a kromatogram elején megjelenő, jellemzően nagy intenzitású csúcs, és a visszamaradt szabad fluoreszcens festék jelenlétére utal. Az alacsony SZFF-csúcsintenzitás a szennyező komponensek hatékony eltávolítását jelenti, így a magas glikán csúcs és alacsony SZFF-csúcs intenzitás együttesen jellemezték a különböző típusú MNP-k glikán-specifikus kötés teljesítményét.

A négyféle ferrit alapú részecskét - CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, MgFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> és NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> - elnevezéssel jelöltem. A szintézist követően a különböző MNP-k kiszáritásra kerültek, majd 50 ml 5 mg/ml MNP koncentrációjú diszperziókat készítettem, úgy, hogy 250 mg szárított MNP-t diszpergáltattam 50 ml Milli-Q vízben. A glikán megkötés hatékonyságának vizsgálatára egészséges humán szérumként gyűjtött mintát alkalmaztam, ami minden MNP-protokoll fejlesztési kísérlethez egységesen került alkalmazásra. A glikán tisztítási eljárás optimalizálását három-három párhuzamos mintán végeztem. Minden egyes minta esetében háromszori UHPLC injektálást alkalmaztam a módszer

reprodukálhatóságának alátámasztása érdekében. Ennek megfelelően mind a négy protokoll esetében 9-9 kromatogram került rögzítésre, amelyek mindegyikén 26 különböző glikoformot és egy SZFF csúcsot határoztam meg.

A négyféle MNP-protokollhoz tartozó összesített glikán fluoreszcens intenzitás átlag és szórás értékek a 8. ábra A alábrán kerültek bemutatásra, míg az SZFF fluoreszcens intenzitását a B diagram szemlélteti. Mivel a kromatogramokon 26 különböző, eltérő méretű és intenzitású glikán csúcs került meghatározásra, az ezekből számított együttes átlagintenzitásokhoz tartozó szórásértékek magasnak bizonyultak. A nagy szórásértékek hatásának kiküszöbölésére relatív szórást, azaz a variációs koefficiens (CV) számoltam, amit a diagramok alatti táblázatban tüntettem fel. A CV értékek értelmezése szempontjából fontos kiemelni, hogy minél alacsonyabb a CV, annál kisebb a mérési szórás az átlaghoz képest, azaz annál jobb a mérési pontosság és reprodukálhatóság. A kapott eredmények alapján (8. ábra) a  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  típusú MNP esetében az összesített glikoformák intenzitásának CV értéke volt a legalacsonyabb (13,33%). Ez az érték a szakirodalom szerint homogén mintaeloszlás és megfelelő reprodukálhatóság esetén elfogadhatónak számít [110]. Mivel jelen esetben az alacsony SZFF intenzitás elérése volt a cél, egyidejűleg nemcsak az alacsony átlagérték, hanem a hozzá tartozó alacsony CV is fontos szempont. A  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  típusú MNP esetében a legalacsonyabb átlagos SZFF-intenzitás értéket kaptam ( $\sim 5 \times 10^7$  EU), amihez 13,43% CV érték társult.



**8. ábra:** A NH<sub>2</sub>-funkcionalizált mágneses nanorészecskék (MNP) négy különböző típusának glikánok tisztítására való alkalmasságának értékelése az összesített glikán csúcs- és SZFF intenzitás értékei alapján. (A) Összesített glikán intenzitás [EU] MNP típusok szerint, medián alapján; (B) SZFF intenzitás [EU] MNP típusok szerint. A glikoformák és SZFF párhuzamos mintákra vonatkozó CV-értékek a diagramok alatti táblázatban kerültek jelölésre.

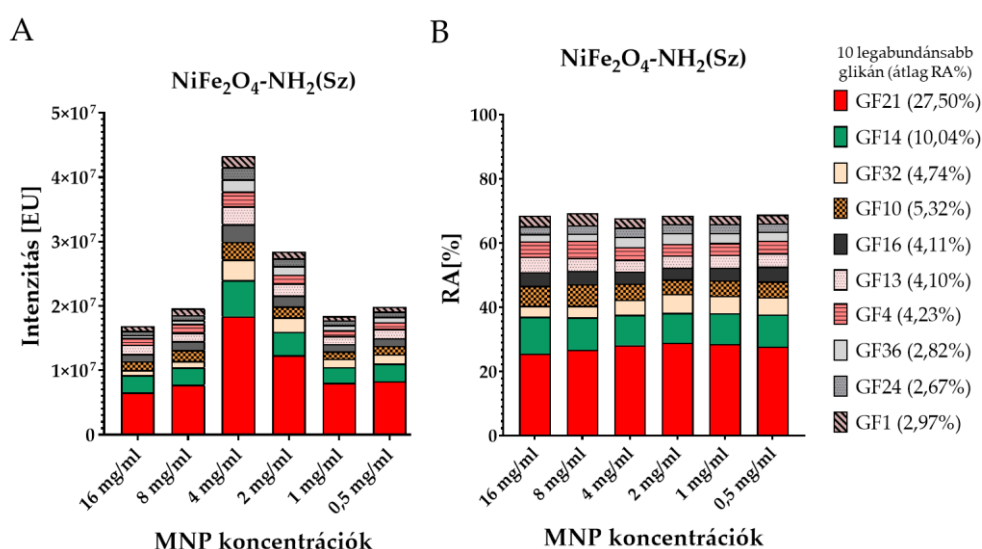
A különböző típusú mágneses nanorészecskék glikánmegkötési hatékonyságának vizsgálata alapján a NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> típusú MNP biztosította a legmagasabb összesített glikán intenzitást és a legalacsonyabb SZFF intenzitást, a többi ferrit prekursorhoz képest. Emiatt a további optimalizáláshoz ezt az MNP-t alkalmaztam.

### 5.1.2. Szárított, glikolos és vizes diszperziós közegek optimalizálása különböző koncentrációk függvényében

A NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> MNP protokoll optimalizálásánál azt vizsgáltam, hogy a különböző diszperziós közegek (szárított – Sz, glikolos – G, vizes – V) és az MNP koncentrációk hogyan befolyásolják a glikánmegkötés, azaz az adszorpció hatékonyságát. Mindhárom közeg esetében koncentráció sorokat állítottam be, majd UHPLC-FLD analízissel a 10 legabundánsabb glikoforma intenzitását (glikánkötési hatékonyság) és RA% (ismételhetőség) értékeit hasonlítottam össze. Ezek a glikoformák a teljes glikánkészlet mennyiségének mintegy 80%-át lefedik, ezért megfelelően reprezentálják a mintákat, miközben a kisebb csúcsok nem torzítják az eredményeket.

NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (Sz) MNP koncentrációjának optimalizálása:

Ebben az alponban a korábban leghatékonyabbnak értékelt NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (Sz) MNP típusnak a 16, 8, 4, 2, 1 és 0,5 mg/ml koncentrációit vizsgáltam. Az oszlopdiagramon feltüntetett színek a különböző glikoformákat jelentik; ezek átlagos relatív abundanciáját a diagram melletti jelmagyarázatban, zárójelben adtam meg. A 9. ábra A oszlopdiagramján megfigyelhető, hogy az összesített intenzitás a 4 mg/ml MNP koncentráció esetében volt a legmagasabb. Az ennél magasabb koncentrációk esetében a kromatogramokon detektált cukormolekulák intenzitása az MNP koncentrációnövelés esetében már nem eredményezett további tisztítási hatékonyságnövekedést. Ennek alapján megállapítható, hogy a deglikozilált szuszpenzióban jelenlévő glikánok mennyisége a ~4 mg/ml koncentrációjú NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (Sz) MNP kapacitásának felel meg. Mivel az egyes glikoformák RA% értékei a különböző protokollok között konzisztensek bizonyultak, az adatok összehasonlíthatónak tekinthetők (9. ábra B).



**9. ábra:** Egészséges humán szérumból származó glikán tisztítás különböző koncentrációjú, NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (Sz) típusú MNP alkalmazásával (16, 8, 4, 2, 1 és 0,5 mg/ml) a tíz legabundánsabb glikoformára vonatkozóan (GF: glikoformák). (A) a 10 legabundánsabb glikoformához tartozó fluoreszcens intenzitás [EU]; (B) a 10 legabundánsabb glikoforma RA% értékei. Az x tengelyeken az alkalmazott MNP-koncentrációk szerepelnek. Az osztott oszlopdiagram színei az egyes glikoformákat reprezentálják, amelyekhez tartozó színek – zárójelben az átlagos RA% értékkel – a diagram melletti jelmagyarázatban találhatóak.

MNP felhasználhatóságát és a protokoll reprodukálhatóságát teszteltem egy nagy mintaszámú kísérletben: 38 sclerosis multiplex betegséggel diagnosztizált és 38 korban és

nemben megegyező egészséges kontroll szérum mintának a teljes szérum N-glikozilációs analízisének mintaelőkészítésében teszteltem (eredmények részletei a 5.2.1. alpontban) [111]. A kísérlet során a protokoll alapvetően jól működött, azonban a  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (Sz) MNP gyors ülepedése és aggregációja miatt további optimalizálásra volt szükség, hogy a pipettázási nehézségeket kiküszöböljem. A problémát a szintézist követő kiindulási diszperzió minőségében láttam. Így a szintézist követően előállított  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  MNP-t a glikolos közegben hagytam, ami a  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (G) elnevezést kapta (Anyagok és módszerek 4.2. alpont 6.3. lépése alapján előkészítve). Továbbá teszteltem a  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  MNP-t úgy is, hogy részecskéket nem szárítottam ki, hanem a vizes mosásokat követően vizes közegben hagytam, amit  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (V) MNP-nek neveztem (Anyagok és módszerek 4.2. alpont 6.2. lépésében ismertettem). A további alpontokban a glikolos és a vizes MNP alapú módszerekhez, a 4 mg/ml  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (Sz) MNPt standardként alkalmaztam.

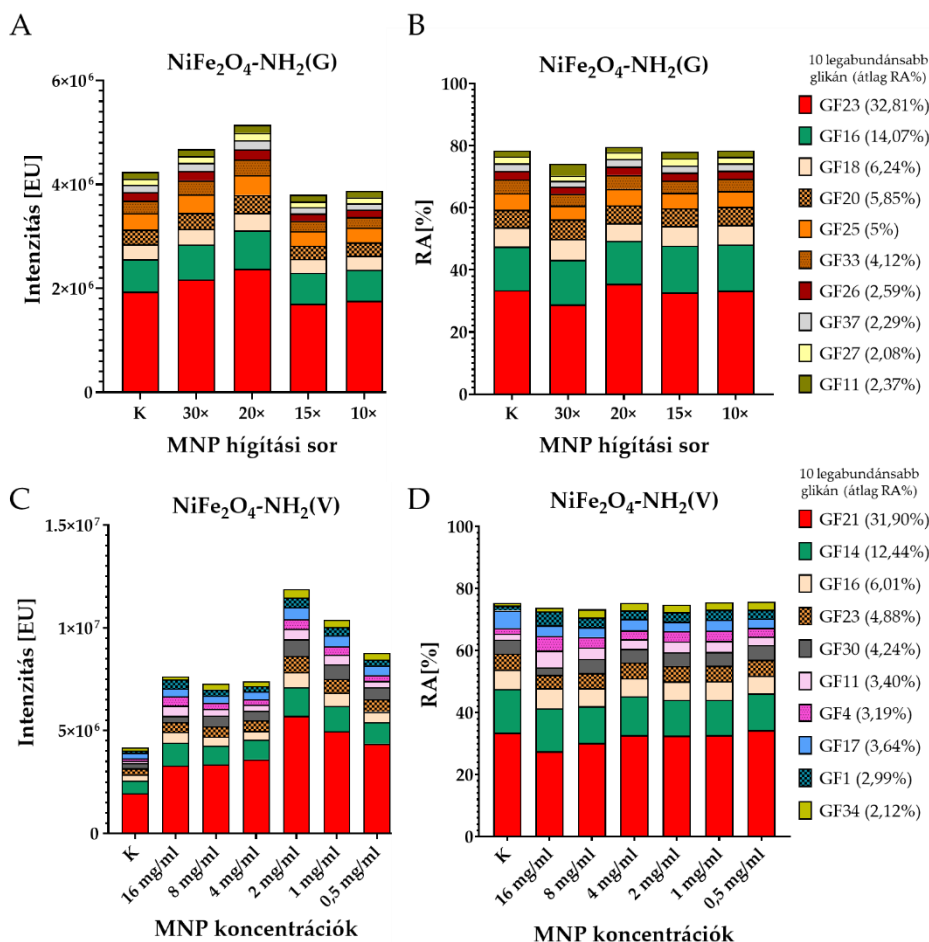
#### Glikolos $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP diszperzió koncentrációk optimalizálása fluoreszcensen jelölt glikánstruktúrák tisztítására:

A  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  MNP részecskék etilén-amin és glikol keverékében hagyva, stabilabb közeget alkottak, a szedimentáció szinte elhanyagolható volt. A  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (G) közegben 30×, 20×, 15× és 10× hígításokat alkalmaztam a kiindulási oldatból. A 10. ábra eredményei alapján megállapítottam, hogy a legmagasabb intenzitásértékeket (10. ábra A) a 20× töménységű  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (G) MNP-vel tisztított glikánok esetében kaptam, a csúcsok arányos eloszlása mellett (10. ábra B).

#### Vizes $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP diszperzió koncentrációk optimalizálása fluoreszcensen jelölt glikánstruktúrák tisztítására:

A  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (V) MNP különböző koncentrációinak (16, 8, 4, 2, 1 és 0,5 mg/ml) hatékonyságát vizsgáltam, amelyet a glikán csúcsok fluoreszcens intenzitásértékei (10. ábra C) és RA% értékei (10. ábra D) alapján értékeltem. Az eredmények alapján a 2- 0,5 mg/ml közötti MNP koncentrációk esetében figyeltem meg a legnagyobb glikán csúcs intenzitásokat. Mivel az optimalizálásnak a célja az is, hogy minél gazdaságosabb protokoll fejlesztésére kerüljön sor, és az könnyen automatizálható legyen, így a 0,5 mg/ml-s MNP koncentrációt kiválasztva végeztem el a további tesztek. Ezzel az alacsony koncentrációval is 2× nagyobb intenzitást kaptam, mint a referenciaként alkalmazott 4 mg/ml koncentrációjú  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (Sz) MNP esetében (K betű az oszlopdiagramon). Továbbá az RA% értékek

variabilitása minimális maradt, ami lehetővé teszi az egyes módszerek közötti közvetlen összehasonlíthatóságot (10. ábra D).



**10. ábra:** Egészséges humán szérumból származó glikán tisztítás különböző koncentrációjú  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  MNP-k alkalmazásával glikolos (G; 30×, 20×, 15×, 10×) és vizes (V; 16, 8, 4, 2, 1 és 0,5 mg/ml) protokollokban. (A, C) a 10 legabundánsabb glikoformához tartozó fluoreszcens intenzitás [EU]; (B, D) a 10 legabundánsabb glikoforma RA% értékei. A kontrollt (K) a 4 mg/ml  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (Sz) MNP-vel történő tisztítás jelentette. Az x tengelyeken az alkalmazott MNP hígítások- és koncentrációk szerepelnek. Az osztott oszlopdiagram színei az egyes glikoformákat reprezentálják, amelyekhez tartozó színekódok – zárójelben az átlagos RA% értékkel – a diagram melletti jelmagyarázatban található. A glikolos és vizes közeg eredményei az első négy legabundánsabb glikoformát (azonos színnel jelölve) leszámítva eltérő glikánprofilokat tartalmaztak.

A kísérleti eredmények alapján a 0,5 mg/ml koncentrációjú, vizes közegben alkalmazott  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  MNP teljesítménye meghaladta a glikolos közegben mért legmagasabb intenzitást biztosító 20× hígítás eredményeit is. A továbbiakban 0,5 mg/ml

NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (V) MNP-protokollt teszteltem elúciós puffer szempontjából, valamint összehasonlítottam két kereskedelmi forgalomban kapható centrifugális oszlopos készlettel.

### 5.1.3. NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> MNP alapú elúciós körülmények optimalizálása centrifugális oszlopos referencia mellett

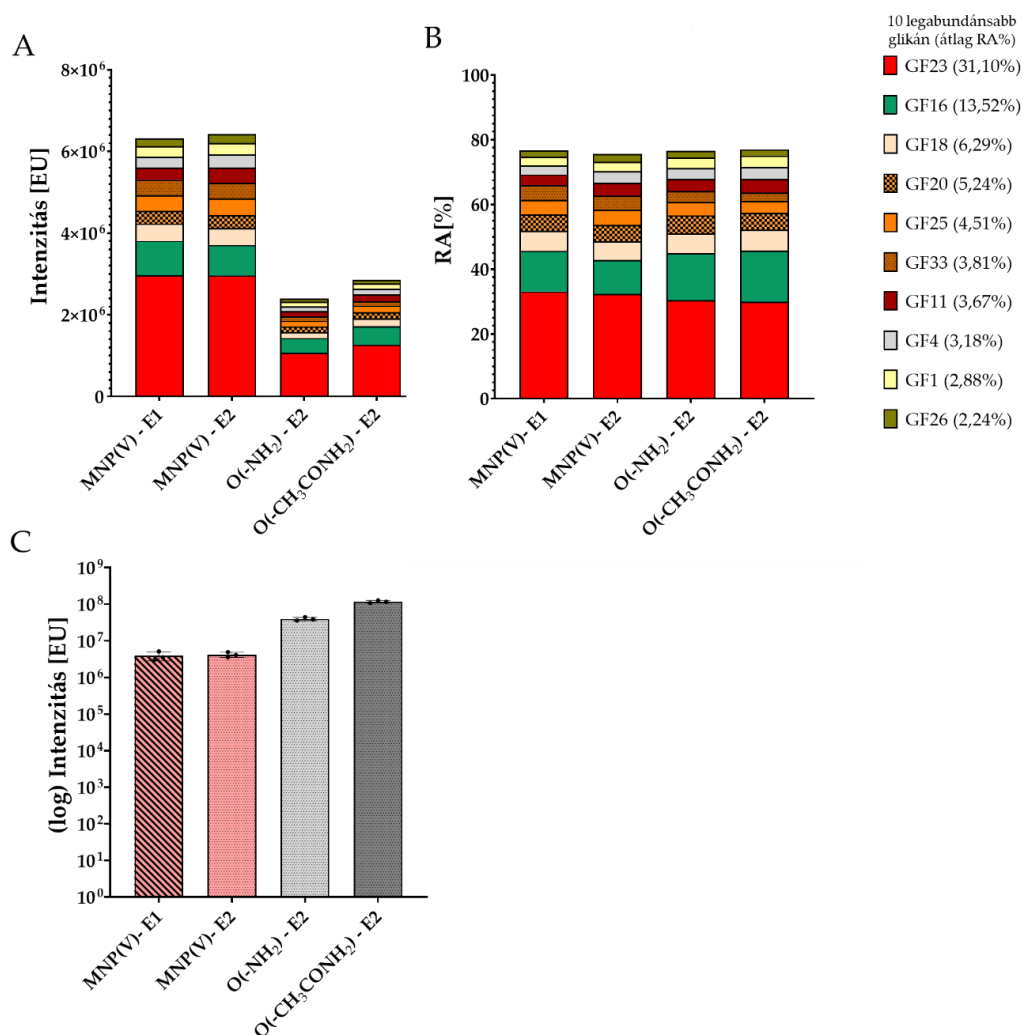
A diszperziós közeg optimalizálását követően kétféle elúciós puffert hasonlítottam össze:

- E1: ultratiszta Milli-Q víz (szakirodalomban leggyakrabban alkalmazott)
- E2: 150 mM ammónium-formiát oldat (pH 4,4), amelyet a kereskedelmi forgalomban elérhető, NH<sub>2</sub>-oszloposkészletekhez ajánlanak.

Továbbá az összehasonlítás kiértékelésébe belevettem a kereskedelmi forgalomban kapható és CH<sub>3</sub>CONH<sub>2</sub>-vagy NH<sub>2</sub> -funkcionalizált MonoSpin centrifugális oszlopokat. Az összehasonlítás érdekében a kromatogramokon tisztítási protokolltól függetlenül ugyanazt a 44 csúcsot integráltam. Az értékelés során a glikán csúcsok intenzitását [EU] és RA% értékeit vettem figyelembe, melyeket a 11. ábrán a 10 legabundánsabb glikoformára vonatkoztatva ábrázoltam.

Az 11. ábra oszlopdiagramjai alátámasztják a 0,5 mg/ml NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (V) MNP glikán tisztítási hatékonyságát, még a kereskedelmi forgalomba elérhető centrifugális oszlopos készletekkel összevetve is. Mindkét elúciós puffer alkalmazása mellett magas glikán csúcs intenzitás (11. ábra A), valamint egyenlő RA% (11. ábra B) eloszlás volt megfigyelhető. Mivel glikán csúcsok intenzitása között nem mutatkozott jelentős eltérés, így a kiértékelés részeként a SZFF csúcs intenzitást is megvizsgáltam, amit a 11. ábra C diagramja mutat logaritmikus skálán. Az SZFF intenzitásból is látható az MNP protokoll lényegesen alacsonyabb intenzitást eredményezett, szemben a centrifugális oszlopos módszerek magas SZFF intenzitásával, ami hatékonyabb glikán megkötésre utal.





**11. ábra:** Elúciós pufferek hatékonyságának vizsgálata: MNP-alapú, valamint kereskedelmi forgalomban kapható NH<sub>2</sub>-vagy CH<sub>3</sub>CONH<sub>2</sub>-funkcionalizált oszlopok glikán tisztítási teljesítményének összehasonlítása a tíz legabundánsabb glikoformára jellemző glikán csúcs intenzitások, RA% és SZFF intenzitás alapján. (A) a 10 legabundánsabb glikoformához tartozó fluoreszcens intenzitás [EU]; (B) a 10 legabundánsabb glikoforma RA% értékei; (C) SZFF intenzitás [EU] logaritmikus skálán. E1: ultratiszta Milli-Q víz, E2: 150 mM ammónium-formiát oldat (pH 4,4), MNP (V): 0,5 mg/ml NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (V) MNP, (O): centrifugális oszlopos készlet. Az x tengelyeken a protokoll elnevezése szerepel.

Az optimalizált MNP-alapú protokoll költséghatékonyságának szemléltetése érdekében összehasonlítottam a kereskedelmi forgalomban elérhető, NH<sub>2</sub>- és CH<sub>3</sub>CONH<sub>2</sub>- funkcionáliszt MonoSpin oszlopos, valamint mágneses gyöngy alapú (AB Sciex LLC) készletek beszerzési árait, az általunk szintetizált NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (V) MNP előállítási költségével. Az összehasonlítás eredményei egyértelműen igazolják az

optimalizált MNP-alapú protokoll jelentős költséghatékonyságát, amelyet a 3. táblázat mutat be.

**3. táblázat:** Az optimalizált  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (V) MNP protokoll és kereskedelmi forgalomban kapható készletek ( $\text{NH}_2$ - és  $\text{CH}_3\text{CONH}_2$ -funkcionalizált MonoSpin oszlopos, mágneses gyöngy alapú glikán mintaelőkészítési készlet) költségeinek összehasonlítása a gyártótól kapott árajánlatok alapján.

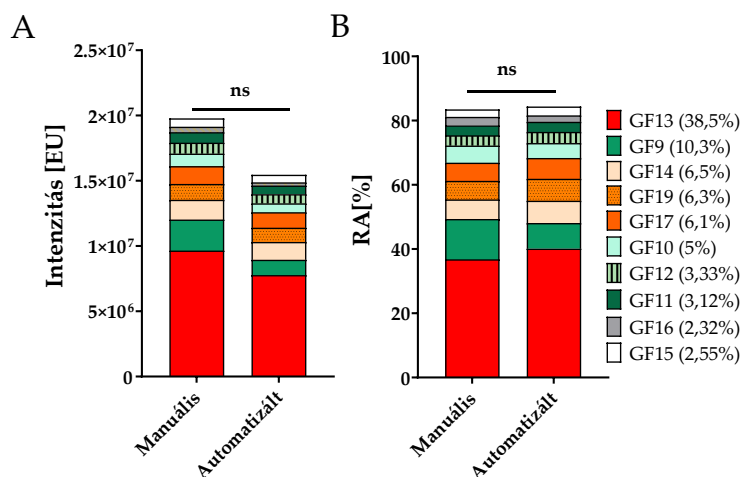
| Tétel                                                                                           | Gyártó / Forrás                                   | Felhasznált mennyiség [g] | Egységár [USD / g vagy ml]         | Anyagköltség [USD]               | Anyagköltség [HUF]              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Vas(III)-nitrát-nonahidrát<br>( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )          | VWR International<br>(Leuven, Belgium)            | 8,08 g                    | 0,141 USD/g                        | 1,14 USD                         | <b>383 HUF</b>                  |
| Nikkel(II)-nitrát-hexahidrát<br>( $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )        | Thermo Fisher Scientific<br>(Kandel, Németország) | 2,91 g                    | 0,232 USD/g                        | 0,67 USD                         | <b>225 HUF</b>                  |
| Nátrium-acetát                                                                                  | Thermo Fisher Scientific<br>(Kandel, Németország) | 12,3 g                    | 0,099 USD/g                        | 1,21 USD                         | <b>406 HUF</b>                  |
| Etilén-glikol                                                                                   | Sigma-Aldrich<br>(St. Louis, MO, USA)             | 150 ml                    | 0,075 USD/ml<br>(átlagos piaci ár) | 11,25 USD                        | <b>3780 HUF</b>                 |
| Etanol-amin                                                                                     | Sigma-Aldrich<br>(St. Louis, MO, USA)             | 35 ml                     | 0,0735 USD/ml                      | 2,57 USD                         | <b>863 HUF</b>                  |
| Abszolút etanol (mosáshoz)                                                                      | Sigma-Aldrich / Thermo                            | 100 ml                    | 0,185 USD/ml                       | 18,50 USD                        | <b>6216 HUF</b>                 |
| <b>Összesen</b>                                                                                 | —                                                 | 22 l – 0,5 mg/ml<br>MNP   | —                                  | 35,3 - 36,0 USD<br>(336 HUF/USD) | <b>~11.870 – 12.100 HUF</b>     |
| Termék megnevezése                                                                              | Gyártó                                            | Készlet mennyisége        | Felhasznált mennyiség/minta        | Teljes ár [HUF]                  | Költség/minta                   |
| 0,5 mg/ml $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (V) MNP                                         | Miskolci Egyetem                                  | 22 l                      | 200 µl/minta                       | ~12.100 HUF                      | <b>0,11 HUF/minta</b>           |
| $\text{NH}_2$ - és $\text{CH}_3\text{CONH}_2$ -<br>funkcionalizált MonoSpin<br>oszlopos készlet | GL Sciences Inc.<br>(Tokió, Japán)                | 100 db                    | 1 db/minta                         | ~171.000 HUF                     | <b>1710 HUF/minta<br/>[105]</b> |
| Mágneses Gyöngy alapú<br>glikán mintaelőkészítési<br>készlet                                    | AB Sciex LLC<br>(Marlborough, USA)                | 100 db                    | 1 db/minta                         | ~400.000 HUF                     | <b>4000 HUF/minta<br/>[112]</b> |

A mintegy 12.000 HUF értékű kiindulási alapanyagok-felhasználásával 300 ml, 37 mg/ml koncentrációjú MNP-diszperziót sikerült előállítani. Ennek további hígítása megközelítőleg 22 l, 0,5 mg/ml koncentrációjú szuszpenzióknak felel meg. Mivel az alkalmazott tisztítási protokollban egyetlen mintához mindösszesen 200 µl MNP- diszperzió szükséges, az előállított mennyiség elméleti kapacitása akár 22 millió minta feldolgozását is lehetővé teszi. Ez a hozam nagyságrendekkel meghaladja a kereskedelmi forgalomban elérhető glikán tisztításra alkalmas készletek kapacitását, így az előállított  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (V) MNP gazdaságos és nagy áteresztőképességű alternatívát jelent a glikán-tisztítási eljárásokban.

#### 5.1.4. MNP-alapú módszer automatizálhatósága

A legjobb teljesítményt nyújtó 0,5 mg/ml  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (V) protokollt integráltam a Hamilton Microlab Prep folyadékkezelő robotra, ammónium-formiát elúciós puffer alkalmazása mellett. A manuális és a robotikus előkészítés (mindkettő 96-lyukú lemez formátumban) összevetése azt mutatta, hogy:

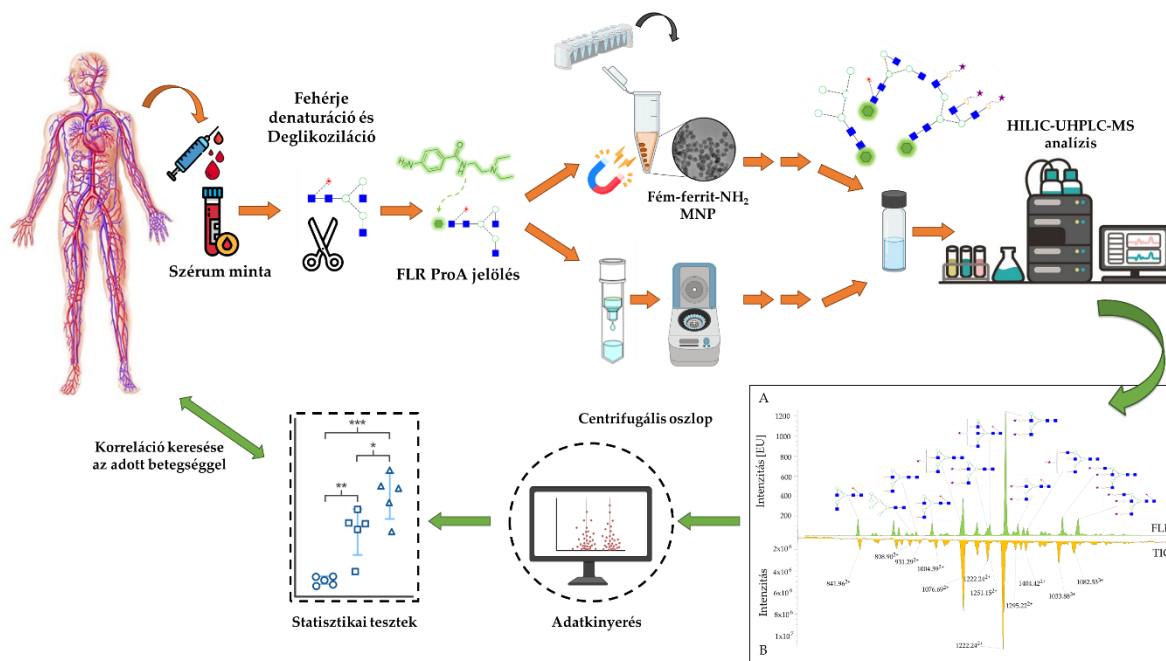
- az intenzitás értékek nem különböztek szignifikánsan (12. ábra A),
- a RA% eloszlás megegyezett a manuális és automatizált mintaelőkészítés kivitelezése esetében, így megbízhatóan alkalmazható az MNP-alapú tisztítás a robotikus platformon is (12. ábra B).



**12. ábra:** Automatizált MNP-protokoll összehasonlítása manuálisan elvégzett tisztítással. (A) a 10 legabundánsabb glikoformához tartozó fluoreszcens intenzitás [EU]; (B) a 10 legabundánsabb glikoforma RA% értékei. ns: statisztikailag nem szignifikáns, Mann-Whitney U-teszt alapján.

## 5.2. Teljes szérumszerű N-glikozilációs vizsgálat a gyulladásos betegségekben

A következő alpontokban alrészekre bontva mutatom be három gyulladásos betegség – sclerosis multiplex, COVID-19 és gyermekkori akut vakbélgyulladás – teljes szérumszerű N-glikozilációs változásainak az eredményeit. Ismertetem a kohortok legfontosabb jellemzőit (mintaszám, minták közötti nemszerinti megoszlás), majd egy külön részben tárgyalom a statisztikai tesztek alapján tett megállapításokat. A szérumszerű N-glikozilációs kísérletek lépéseit a 13. ábra foglalja össze.



**13. ábra:** Kísérleti munkafolyamat a humán szérumszerű N-glikozilációs mintázatok elemzésére

Fontos megjegyezni, hogy a különböző kohortokat eltérő időben vizsgáltam, így az N-glikán komponensek szeparálása és azonosítása nem eredményezte mind a három kohortban ugyanazoknak a glikoformáknak ugyanazzal a retenciós idővel történő azonosítását. Ennek ellenére mindhárom betegségcsoporthoz tartozó analízis során minimum 40 különálló glikoformát sikerült detektálni, eltérő retenciós idők mellett, a kohort összes mintájában. Az tömegspektrométerben azonosított glikoformák jellemzőit a 2. számú melléklet táblázatai foglalják össze. Feltüntettem az elméleti  $m/z$  értéket, a csúcs sorszámát, a retenciós időt (RT), az integrált csúcsok RA% értékeit mintacsoportonként, valamint az elvégzett statisztikai tesztek eredményét (sclerosis multiplex: 1. táblázat; COVID-19: 2. táblázat; vakbélgyulladás: 3. táblázat).

A kromatogramok integrálásával kapott RA% értékeket használtam fel adatként különböző statisztikai elemzések elvégzéséhez, mivel ez a megközelítés lehetővé teszi a

glikánprofilok relatív mennyiségi összehasonlítását függetlenül az abszolút koncentrációtól. A százalékos eloszlás továbbá normalizálja az adatokat, így kiküszöböli a mintaelőkészítésből vagy injektált mennyiségből fakadó technikai variabilitást.

A statisztikai tesztek egyrészt az adatok normalitásának vizsgálatára, másrészt a beteg és egészséges mintacsoportok közötti szignifikáns különbségek feltárására, valamint az adatok közötti korrelációs összefüggések elemzésére végeztem el. Minden kísérletet az adathalmaz normalitásvizsgálatával, azaz Shapiro-Wilk teszttel kezdtem. Mivel az adatok nagy része nem követte a normáeloszlást, így Mann-Whitney vagy Kruskal-Wallis nemparametrikus tesztek alkalmaztam a mintacsoportok (egészséges és beteg) közötti szignifikáns különbségek keresésére.

### 5.2.1. Sclerosis multiplex

A kísérletben összesen 76 darab humán szérummintát vizsgáltam, melyek között 38 darab sclerosis multiplex betegséggel diagnosztizált (SM) és 38 darab egészséges (kontroll) embertől származó szérum minta tartozott, melyeket nem szerint alcsoportokra osztottam:

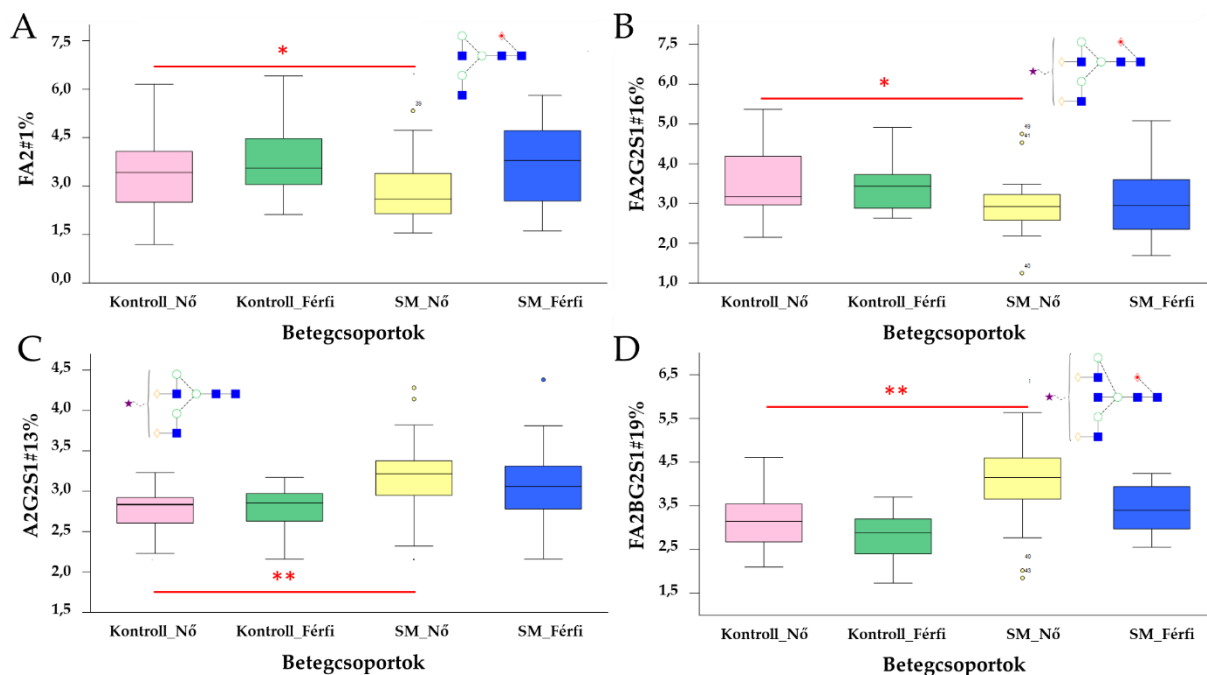
- Kontroll\_Férfi (10 darab minta),
- SM\_Férfi (10 darab minta),
- Kontroll\_Nő (28 darab minta),
- SM\_Nő (28 darab minta) csoportok lettek megkülönböztetve.

A beteg és egészséges csoportok szérummintáiból származó N-glikánok mintaelőkészítésében az 5.1.1. pontban meghatározott 4 mg/ml  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (Sz) MNP protokollt alkalmaztam. Az HILIC-UHPLC-MS analízis során 43 darab jól definiált csúcsot azonosítottam az SM beteg és egészséges kontroll minták esetében egyaránt.

#### A kiértékeléshez alkalmazott statisztikai tesztek eredményei

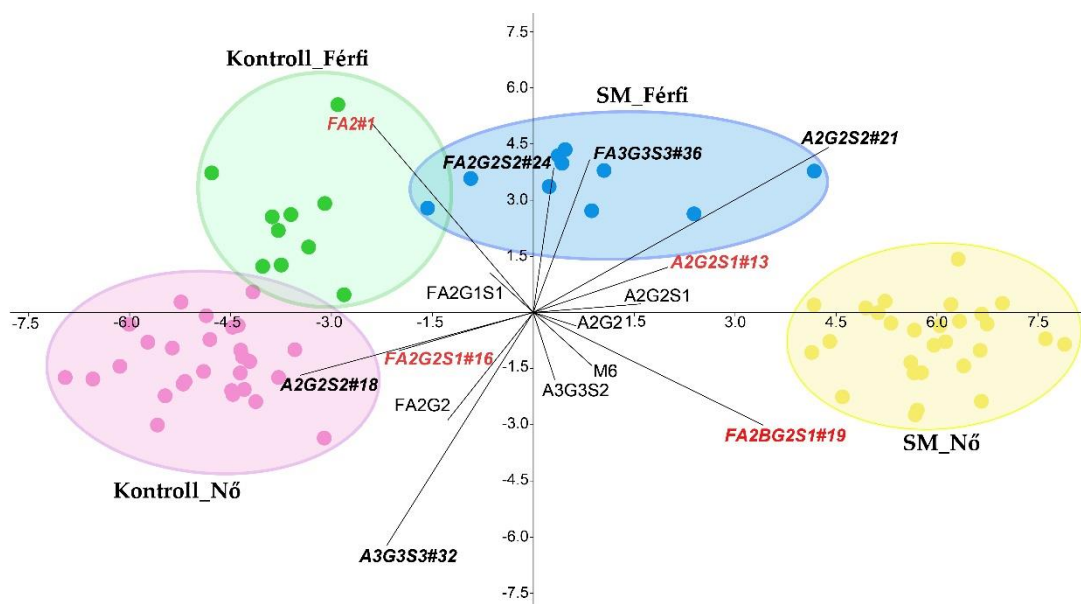
Az integrálással nyert RA% adatokon végzett statisztikai tesztek eredményei alapján összesen 15 olyan N-glikán szerkezetet azonosítottam, melyek szignifikáns eltérést mutattak a Kontroll\_Nő és SM\_Nő mintacsoportok között. A boxplot diagrammon való ábrázoláshoz (14. ábra) kiválasztottam a legalább 3,0 RA% értékkel jellemezhető és a mintacsoportok közötti összehasonlításban legalább  $p < 0,05$  szignifikancia szintet mutató N-glikoformákat. A kiválasztott N-glikánok közül a fukozilált és neutrális FA2#1 (A), valamint a fukozilált és monoszializált FA2G2S1#16 (B) struktúra szignifikáns csökkenést mutatott az SM\_Nő mintacsoportban a Kontroll\_Nő csoporthoz képest. Ezzel szemben az afukozilált

A2G2S1#13 párja (C) és a biszektilált FA2BG2S1#19 párja (D) esetében szignifikáns növekedést figyeltem meg.



**14. ábra:** Szignifikáns eltéréseket mutató N-glikán szerkezetek a nem szerint csoportosított kontroll és SM mintacsoportok között. A: FA2#1 (RT: 16,07 perc;  $[842,11]^2$ ;  $p=0,04$ ), B: FA2G2S1#16 (RT: 25,89 perc;  $[1149,74]^{2+}$ ;  $p=0,05$ ), C: A2G2S1#13 (RT: 24,57 perc;  $[1076,77]^{2+}$ ;  $p=0,01$ ), D: FA2BG2S1#19 (RT: 26,90 perc;  $[1251,62]^{2+}$ ;  $p=0,01$ ). \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ .

A 15. ábrán bemutatott LDA koordináta rendszerben a vizsgált mintacsoportok jól elkülönülnek az első két tengely mentén. Az x tengely menti szeparáció a kontroll és SM csoportok, míg az y tengely menti eltérés a nem szerinti különbségeket tükrözi. Az első diszkriminancia függvényhez (x tengely) a szoftver által kalkulált sajátérték 24,50 volt, amely az összvariancia 84,80%-át magyarázta, míg a második, y tengely, sajátértéke 3,50 volt, azaz az összvariancia 12,05%-a. A biplot vizualizációban megfigyelhető, hogy több glikánstruktúra is jelentős szerepet mutatott a csoportok megkülönböztetésében. A 14. ábrán bemutatott négy, szignifikánsan változott struktúrák közül (piros színnel jelölve) az A2G2S1#13 és a FA2BG2S1#19 jelentős vektorként figyelhetők meg az SM\_női mintacsoportok elválásában.



**15. ábra:** Lineáris diszkrimináns analízis az SM és Kontroll mintacsoportok elválásának vizsgálatára. Piros színnel jelölve a Kruskal-Wallis tesztben szignifikánsan változott glikán struktúrákat. Fekete félkövér stílussal kiemelt glikoformok az LDA analízisben az első két tengely mentén kiemelkedő hozzájárulást mutattak: A2G2S2#18 (RT: 26,78 perc;  $[1222,06]^{2+}$ ), A2G2S2#21 (RT: 28,23 perc;  $[1222,06]^{2+}$ ), FA2G2S2#24 (RT: 29,24 perc;  $[1295,09]^{2+}$ ), A3G3S3#32 (RT: 32,91 perc;  $[1550,17]^{2+}$ ), FA3G3S3#36 (RT: 34,21 perc;  $[1623,20]^{2+}$ ).

### 5.2.2. COVID-19

A COVID-19 vírusos fertőzés szérumban fehérjék N-glikozilációjára gyakorolt hatásának vizsgálatára irányuló kísérletben négy csoport került elkülönítésre attól függően, hogy a személy, akitől a szérumban minta származott átesett-e a COVID-19 fertőzésen, illetve kapott-e Pfizer-BioNTech COVID-19 mRNA alapú vakcinát:

- Covid-Oltás- csoport: nem esett át COVID-19 fertőzésen és nem kapott Pfizer-BioNTech COVID-19 mRNA alapú vakcinát
- Covid-Oltás+ csoport: nem esett át COVID-19 fertőzésen, de kapott Pfizer- BioNTech Covid-19 mRNA alapú vakcinát
- Covid+Oltás- csoport: átesett COVID-19 fertőzésen és nem kapott Pfizer- BioNTech COVID-19 mRNA alapú vakcinát
- Covid+Oltás+ csoport: átesett COVID-19 fertőzésen és kapott Pfizer- BioNTech COVID-19 mRNA alapú vakcinát

Az N-glikoziláció elemzés előtt ELISA készlet felhasználásával ellenőriztem a szérumminták SARS-CoV-2 ellen specifikusan termelődött IgG antitest szintjét. Az N- glikozilációs mintaelőkészítést NH<sub>2</sub>-funkcionalizált centrifugális oszlop alkalmazásával végeztem, majd HILIC-UHPLC-MS analízissel 41 darab jól elvált N-glikán csúcsot azonosítottam a kromatogramokon.

#### ELISA Immunoassay teszt eredményei

Az ELISA teszt elvégzése után a Covid-Oltás- csoporton belül néhány mintában megfigyelhető volt a pozitív kontroll mintához tartozó küszöbértéktől ( $[A_{450}] \geq 0,1$ ) magasabb abszorbancia, ami azt jelentette, hogy a szérum mintában jelen volt COVID-19 ellen termelődött specifikus-antitest. A pozitív eredményt mutató minták kizárásra kerültek az analízisből, mivel azok valószínűleg technikai artefaktumként vagy nem specifikus kötődés következtében adtak hamis pozitív reakciót. Az ELISA teszt eredményeit az 4. táblázat foglalja össze, ahol a legmagasabb abszorbanciát a Covid+Oltás+ mintacsoportban mértem ( $A_{450}=1,04$ ), ezt követte a Covid-Oltás+ ( $A_{450}=0,69$ ), ami a tesztben alkalmazott gyári pozitív kontroll abszorbanciájával ( $A_{450}=0,71$ ) közel azonos volt. Majd a Covid+Oltás- csoport abszorbanciája volt a legalacsonyabb ( $A_{450}=0,4$ ) pozitív értékű. A glikozilációs kísérletek során kontrollként a Covid-Oltás- csoportot alkalmaztam, mivel ennek a csoportnak az abszorbanciája - a pozitív hamis minták kizárásával - átlagosan  $A_{450}=0,06$  értékű volt, ami negatívnak tekinthető, azaz nem tartalmazott kimutatható mennyiségű, COVID-19 vírusfertőzés ellen termelődött antitestet.

**4. táblázat:** ELISA teszt eredményének összefoglalása: a spektrofotometriás abszorbancia és a tesztben alkalmazott küszöbérték alapján meghatározott pozitivitás eredményeket tartalmazva. Abszorbancia küszöbérték:  $[A_{450}]_{\text{pozitív kontroll}} \times 0,15 = 0,1$ ; negatív:  $[A_{450}] < 0,1$ ; pozitív:  $[A_{450}] \geq 0,1$ .

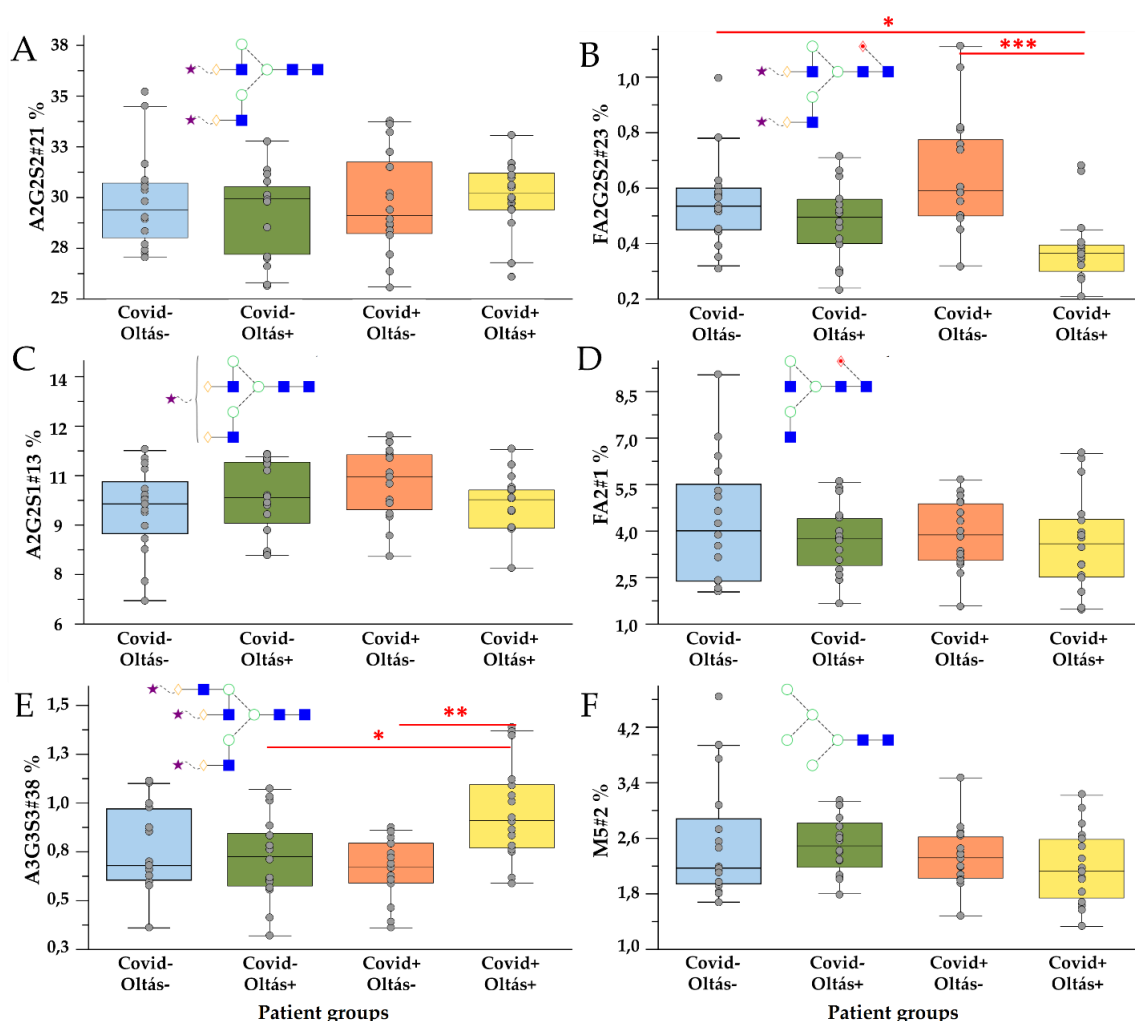
| Mintacsoport     | Átlagolt abszorbancia $[A_{450}]$ | Teszt eredménye |
|------------------|-----------------------------------|-----------------|
| Negatív kontroll | 0,04                              | negatív         |
| Pozitív kontroll | 0,71                              | pozitív         |
| Covid-Oltás-     | 0,06                              | negatív         |
| Covid-Oltás+     | 0,69                              | pozitív         |
| Covid+Oltás-     | 0,40                              | pozitív         |
| Covid+Oltás+     | 1,04                              | pozitív         |

#### A kiértékeléshez alkalmazott statisztikai tesztek eredményei

A mintacsoportok összehasonlítása alapján a szializáció különösen a COVID-19-en átesett csoportokban (Covid+) mutatott jelentős változást. A szialsavtartalom növekedése a

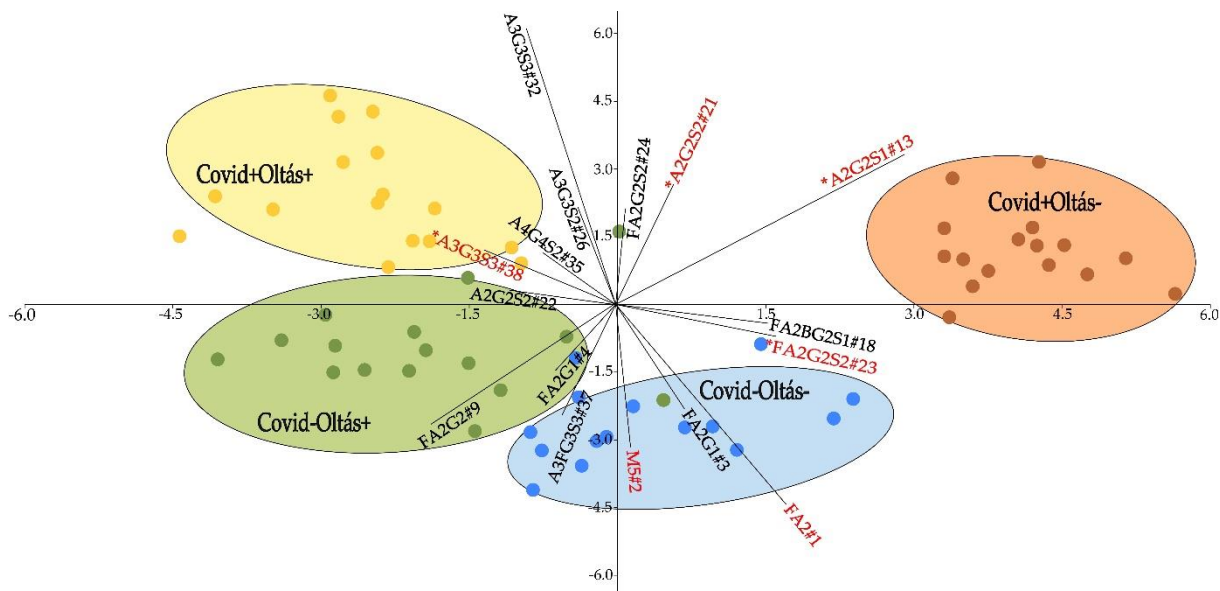


Covid+Oltás+ csoportban volt a legjelentősebb (16. ábra A, C, E) és afukozilált struktúrák esetében mutatott emelkedést. A monoszializált A2G2S1#13 struktúra még nem mutatott szignifikáns változást (C), viszont ahogy a szialsavak száma növekedett – A2G2S2#21 (A), A3G3S3#38 (E) – úgy lett egyre magasabb a glikán RA% értéke a Covid+Oltás+ csoportban az Covid+Oltás-mintacsoporthoz képest. A szializáció fontosságát az is alátámasztotta, hogy egyik neutrális struktúra sem mutatott szignifikáns változást. (16. ábra D diagram – FA2#1 és 16. ábra F diagram – M5#2). A fokozott szializáció az afukozilált struktúrákon volt megfigyelhető, amit megerősít az, hogy az FA2G2S2#23 esetében szignifikánsan alacsonyabb RA% értéket detektáltam a Covid+Oltás+ csoportban (16. ábra B).



**16. ábra:** Szializált és neutrális glikánstruktúrák RA% értékeinek változása a COVID-19 kohortban. A: A2G2S2#21 (RT: 26,30 perc; [1222,06]<sup>2+</sup>), B: FA2G2S2#23 (RT: 27,33 perc; [1295,09]<sup>2+</sup>; p=0,02; p<0,001), C: A2G2S1#13 (RT: 22,47 perc; [1076,52]<sup>2+</sup>), D: FA2#1 (RT: 13,30 perc; [841,94]<sup>2+</sup>), E: A3G3S3#38 (RT: 34,12; [1550,18]<sup>2+</sup>; p=0,046; p=0,01), F: M5#2 (RT: 14,67 perc; [727,89]<sup>2+</sup>). \*\*: p≤0,01; \*\*\*: p≤0,001.

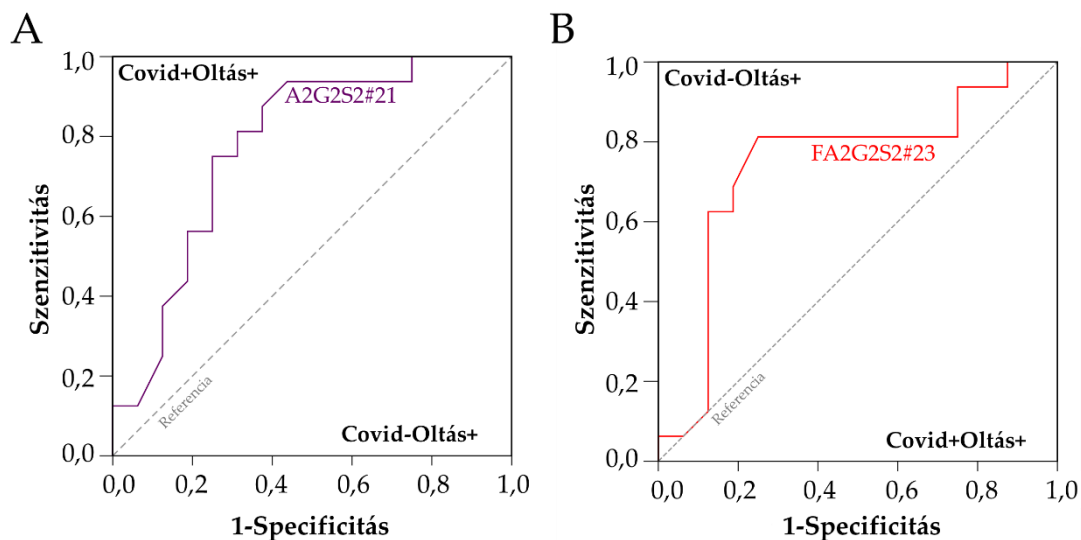
Az előző eredményeket a 17. ábrán bemutatott LDA elemzés eredménye is alátámasztotta, ahol a nem-fukozilált, szializált struktúrák a Covid+ csoportok elválásához, míg a neutrális és fukozilált struktúrák a Covid- csoportok elválásához járultak hozzá leginkább. A csoportok az SM kísérlethez hasonlóan jól elkülönültek az első két diszkriminancia függvény alapján, mivel az x tengely 54,9%-ban, míg a második tengely (y tengely) 30,44%-ban határozta meg az összvarianciát.



**17. ábra:** A glikán struktúrák területszázalék-alapú diszkriminációja COVID-19 fertőzésen átesett (Covid+) és COVID-19 fertőzésen nem átesett (Covid-) csoportok között az oltottság függvényébe. Piros színnel jelölve a 16. ábráról származó struktúrák, \* szimbólummal jelölve a szignifikánsan változó struktúrák: A2G2S2#21 (RT: 26,30 perc;  $[1222,06]^{2+}$ ), A2G2S1#13 (RT: 22,47 perc;  $[1076,52]^{2+}$ ), FA2G2S2#23 (RT: 27,33 perc;  $[1295,09]^{2+}$ ), FA2#1 (RT: 13,30 perc;  $[841,94]^{2+}$ ), A3G3S3#38 (RT: 34,12;  $[1550,18]^{2+}$ ), M5#2 (RT: 14,67 perc;  $[727,89]^{2+}$ ).

Az afukoziláció jelentős szerepet töltött be az oltott mintacsoportokban. A 18. ábrán a ROC görbe eredménye alátámasztja, hogy az afukozilált A2G2S2#21 struktúra a Covid+Oltás+ csoportot (A) és annak fukozilált párja az FA2G2S2#23 a Covid-Oltás+ csoportot (B) jellemzi szignifikánsan. Mind a két glikán 0,7 feletti görbe alatti területtel (AUC) és ahhoz tartozó alacsony varianciával (std. deviáció) jellemezhető, ami a teszt megbízhatóságát erősíti. Továbbá a  $p < 0,05$  aszimptotikus szignifikancia értékek is alátámasztják a megfigyelést, hogy az eredmény nem véletlen, az adott marker valóban elkülönül a pozitív és a negatív esetek között. Mindkét biomarker esetében a

konfidenciaintervallum alsó határa meghaladja a 0,5-ös értéket, ami alátámasztja a tesztek megbízhatóságát és a véletlen hatásának kizárását. (18. ábra).



| Teszt<br>változó | AUC  | Std. deviáció | Aszimptotikus<br>szignifikancia <sup>b</sup> | Aszimptotikus 95% -os konfidencia<br>intervallum |             |
|------------------|------|---------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------|
|                  |      |               |                                              | Alsó határ                                       | Felső határ |
| A2G2S2#21        | 0,78 | 0,09          | 0,01                                         | 0,61                                             | 0,94        |
| FA2G2S2#23       | 0,74 | 0,09          | 0,02                                         | 0,56                                             | 0,93        |

a. Nemparaméteres feltételezés mellett

b. Nullhipotézis: a terület valódi értéke=0,5

**18. ábra:** A2G2S2#21 és FA2G2S2#23 glikánstruktúrák ROC analízise a fertőzésen való átesettség hatásának elkülönítésére oltott mintacsoportokon belül. A: A2G2S2#21 (RT: 26,30 perc;  $[1222,06]^{2+}$ ) struktúra ROC görbéje, amely a Covid+Oltás+ csoportot jellemzi, B: FA2G2S2#23 (RT: 27,33 perc;  $[1295,09]^{2+}$ ) struktúra ROC görbéje, amely az Covid- Oltás+ csoportot jellemzi. A ROC görbék alatti táblázat magába foglalja az AUC értékeket, a hozzájuk tartozó standard hibát, valamint a szignifikancia szinteket és 95%-os konfidenciaintervallumokhoz tartozó alsó-és felső határ értékeit.

Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a glikozilációs mintázatok elemzése érzékeny és megbízható módszer lehet a COVID-19 fertőzés és az oltás immunológiai hatásainak elkülönítésére.

### 5.2.3. Gyermekkori akut vakbélgyulladás

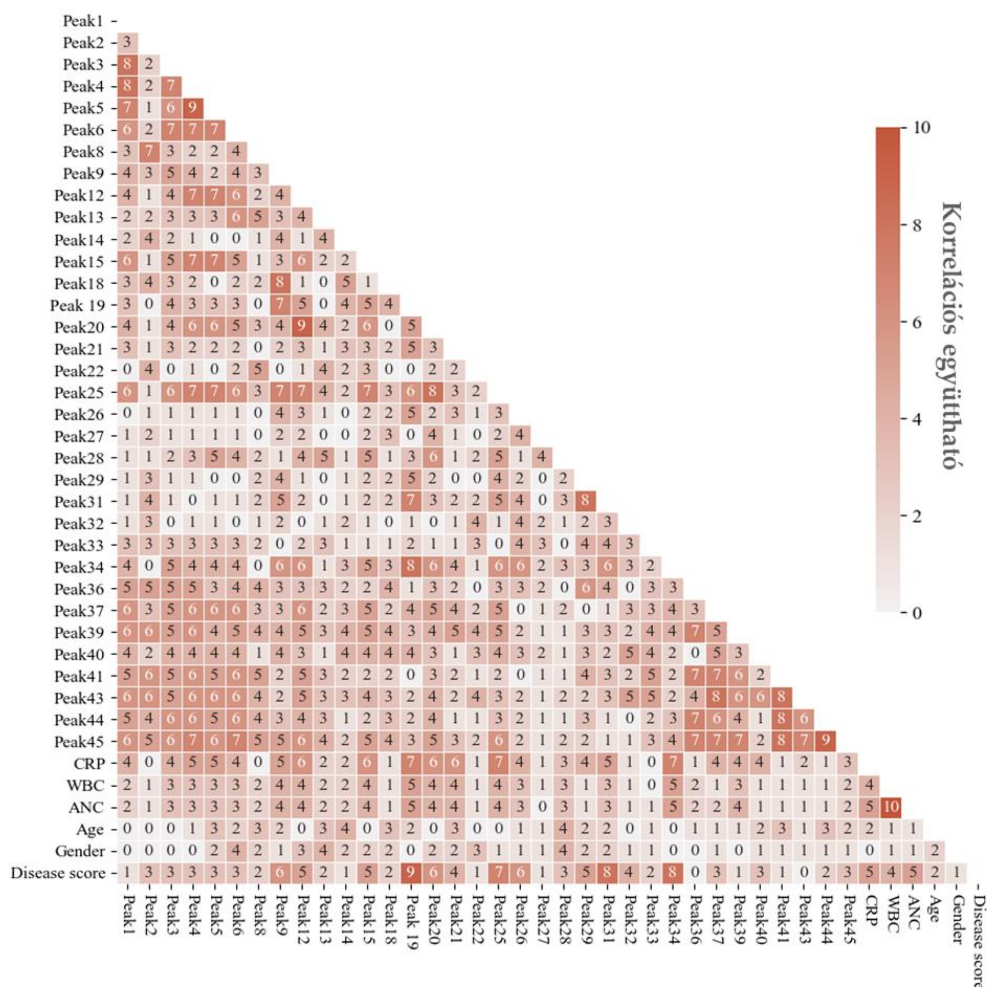
A vakbélgyulladással diagnosztizált gyermekektől vett szérumminták N- glikozilációs vizsgálatának kiértékelését két részre bontottam. A kísérletek kiértékelésekor először csak a beteg (A jelölés; 40 darab minta) és kontroll (K jelölés;

38 darab minta) csoportokat hasonlítottam össze. A kísérletek második részében a kontroll csoporton belül a hasi fájdalommal betegfelvételre került gyermekektől vett szérumból álló alcsoportot elkülönítettem (HK jelölés; 9 darab minta) a tünetmentes kontroll csoporttól, így három csoportos összehasonlítást végeztem. A mintákhoz C-reaktív fehérje (CRP), teljes fehérvérsejtszám (WBC) és abszolút neutrofil sejtszám (ANC) laborértékek társultak, melyeket a statisztikai elemzésekben, mint független változókat vizsgáltam.

Az N-glikozilációs kísérletekben  $\text{NH}_2$ -funkcionalizált centrifugális oszlopot alkalmaztam a glikán tisztítás során. Az elválasztást követően UNIFI szoftverben 48 darab jól elvárt N-glikán csúcsot integráltam. A statisztikai elemzések egy részét és az ábrázolást Python szoftverben végeztük, melyben Dr. Garami Attila nyújtott segítséget.

#### Két csoportos kiértékelés alapját képző statisztikai tesztek

Fontos megjegyezni, hogy a statisztikai elemzésből kizárásra kerültek a 0,4% alatti relatív abundanciájú glikánstruktúrák a mérési zaj csökkentése, valamint a statisztikai és biológiai interpretálhatóság növelése érdekében. Point-Biserial rangkorrelációs tesztekkel vizsgáltam a betegség és a glikánstruktúra közötti, míg Spearman-korrelációs elemzéssel a glikánstruktúrák egymás- vagy laborparaméterek közötti összefüggését. A korreláció eredményeként kapott -1 és +1 közötti korrelációs együtthatókat, a szignifikancia értékek szerint, 0-tól 10-ig terjedő korrelációs együttható skálán (R) színkódolással jelöltem és ábrázoltam a 19. ábrán látható hőtérképen [113]. Az ábrán a különböző glikánokat számmal jelöltem (például Peak1, Peak2 stb.) a szoftverben való egyszerűbb kezelhetőség miatt. Az A2G2S1#19, A2G2S2#25, A2BG3S2#31 és A3G3S3#34 glikán struktúrák erős, lineáris összefüggést mutatnak a betegség jelenlétével (a hőtérképen "disease score"-ként jelölve), amit a  $7 \leq R \leq 10$  közötti értékek támasztanak alá [108]. Továbbá megfigyelhető, hogy a betegséggel erős lineáris korrelációt mutató struktúrák más glikán struktúrákkal és a CRP laboradattal is hasonlóan erős korrelációt mutattak ( $R \geq 7$ ). A legerősebb korreláció ( $R=10$ ) az ANC és a WBC laborparaméterek között jött létre, aminek oka, hogy a WBC egy részhalmazát képezi az ANC, így ha a WBC értéke nő, akkor az ANC is relevánsan nőhet.



**19. ábra:** A Spearman- és Point-Biserial korrelációs elemzés hőterképe, amely az egyes glikán csúcsok vakbélgyulladás-betegségpontszámra gyakorolt hatását szemlélteti. A 7-nél magasabb értékeket erős korrelációnak tekintettük. (A paraméterpárok közötti korrelációs együtthatók ( $R$ ) értelmezése:  $10^{-1}$  skálán,  $p < 0,001$ ) [113].

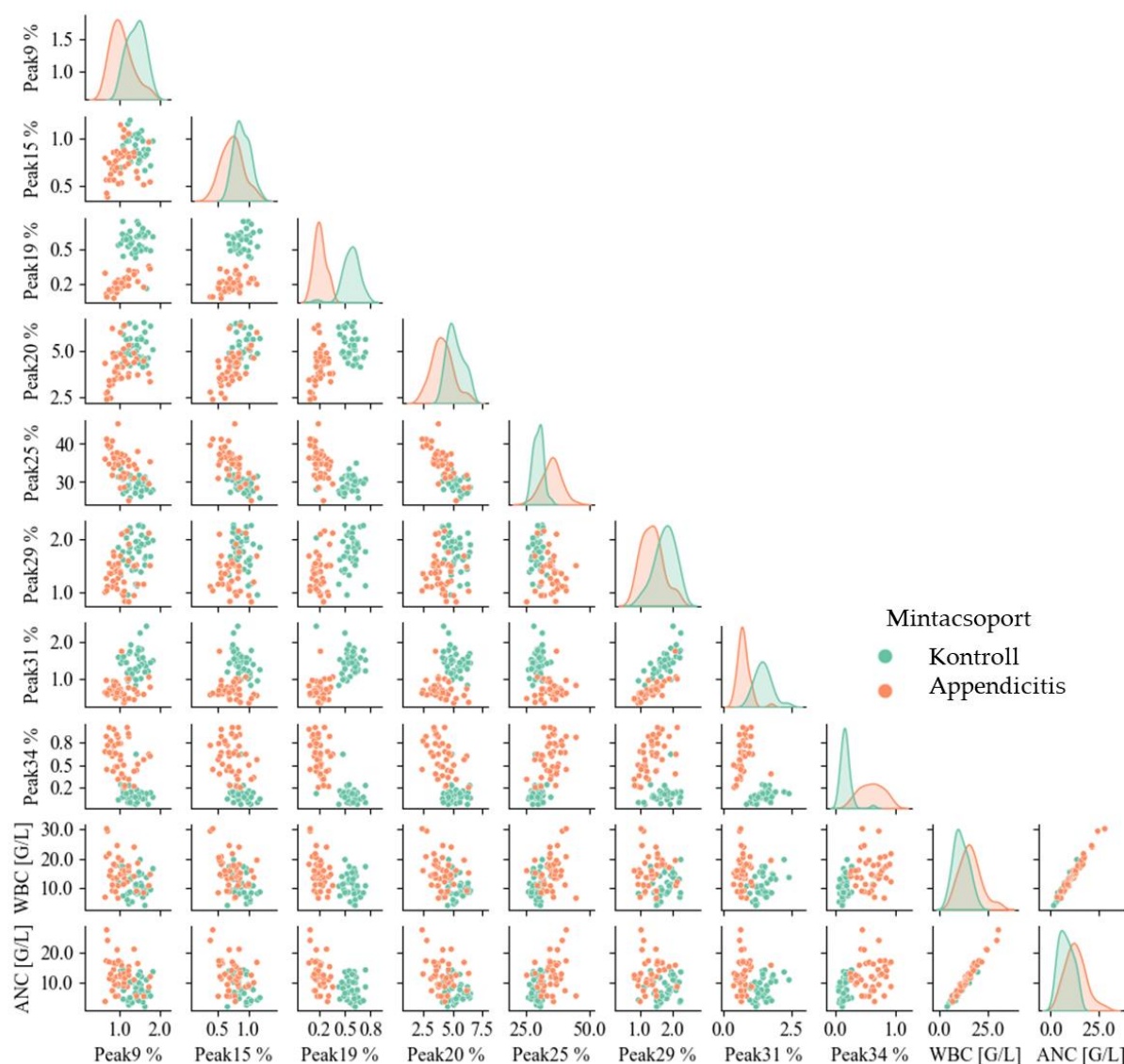
Az 5. táblázat átláthatóan összefoglalja azokat a glikánokat, amelyek a teszt során szignifikáns korrelációt mutattak, azaz magas korrelációs értékkel rendelkeztek. A táblázat bal oldalán azok a glikánstruktúrák szerepelnek, amelyek erős kapcsolatot mutattak a betegséggel. A jobb oldalon ezekhez párosítva azok a glikánok láthatók, amelyek szintén szignifikáns korrelációt mutattak, de a glikánokkal és nem a betegséggel. A táblázat alsó részében pedig a laborparaméterek és glikánstruktúrák közötti korrelációs eredmények kerültek összefoglalásra.

**5. táblázat:** A glikánstruktúrák és betegség közötti korreláció Point-Biserial teszttel és a glikán struktúrák közötti korreláció Spearman-teszttel (zárójelben feltüntetve a korrelációs együttható értékek (R), a hőtérképről). A táblázat alsó részében az adott klinikai paraméter és glikán struktúrák közötti Spearman-teszttel elvégzett korrelációs eredménye.

| Glikánstruktúra és betegség közötti korreláció         | Glikánstruktúrák közötti korreláció |
|--------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Point-Biserial teszt: ***p<0,001 (R)                   | Spearman teszt: ***p<0,001 (R)      |
|                                                        | ***A2G2#9 (6)                       |
| ***A2G2S1#19 (9)                                       | ***A2BG3S2#31 (7)                   |
|                                                        | ***A3G3S3#34 (8)                    |
|                                                        | ***FA2G1#4 (7)                      |
|                                                        | ***FA2G1#5 (7)                      |
| ***A2G2S2#25 (7)                                       | ***A2G2#9 (6)                       |
|                                                        | ***FA2G2#12 (7)                     |
|                                                        | ***M4G1S1#15 (7)                    |
|                                                        | ***A2FG2S1#20 (8)                   |
| ***A2BG3S2#31 (8)                                      | ***A2BG3S2#29 (8)                   |
|                                                        | ***A2G2S1#19 (7)                    |
| ***A3G3S3#34 (8)                                       | ***A2G2S1#19 (8)                    |
| Klinikai adatok és glikánstruktúrák közötti korreláció |                                     |
| Spearman teszt: ***p<0,001 (R)                         |                                     |
|                                                        | ***A2G2S1#19 (7)                    |
| CRP                                                    | ***A2G2S2#25 (7)                    |
|                                                        | ***A2BG3S2#31 (7)                   |
| WBC                                                    | ***ANC (10)                         |

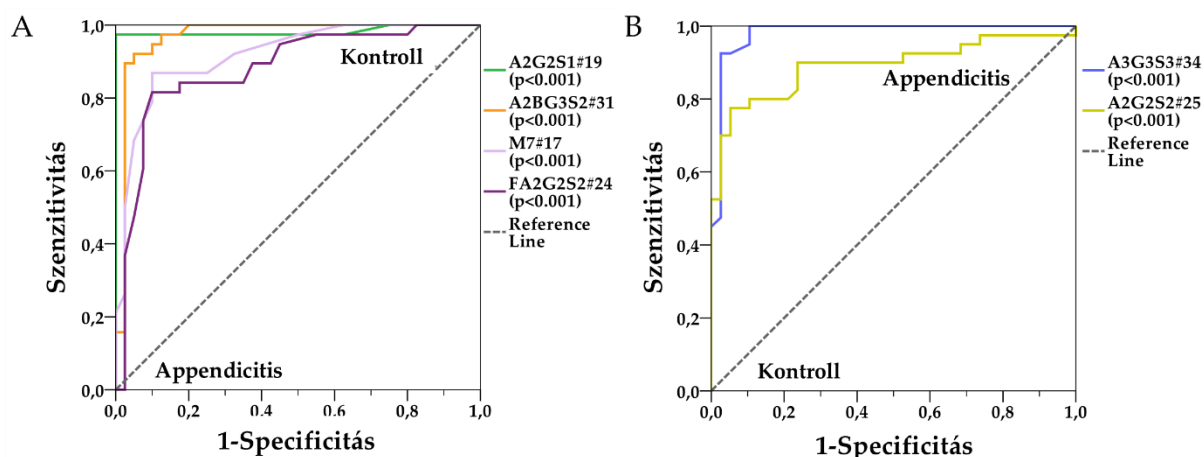
A kétcsoportos összehasonlítás során kapott statisztikailag szignifikánsan eltérő struktúrák már a hőtérképen is erős korrelációt jeleztek a betegséggel: A2G2S1#19, A2G2S2#25, A2BG3S2#31 és A3G3S3#34 (2. számú melléklet 3. táblázat). A mintacsoportok közötti szeparáció vizualizálására a 20. ábrán bemutatott pair plot diagramot használtam. Ez az ábrázolási mód szintén megerősíti azt az észrevételemet, hogy az A2G2S1#19, A2BG3S2#31 és A3G3S3#34 glikánstruktúrák RA% értékének függvényében a kontroll- és a vakbélgyulladásos csoportok jobban elválnak egymástól. Az A2G2S1#19, A2BG3S2#31 és A3G3S3#34 struktúrák más glikánokkal mutatott korrelációja szintén befolyásolta a betegcsoportok közötti elkülönülés mértékét, pont azoknál a glikán pároknál, amelyeknél már a korrelációs együttható is magas volt. Például a magasabb RA% értéke az A2G2S1#19 struktúrának és az alacsonyabb RA% értéke az A3G3S3#34 struktúrának a kontroll csoportot jellemezte. Így megállapítható, hogy minél magasabb az A2G2S1#19 struktúra és minél alacsonyabb az A3G3S3#34 glikánok mennyisége annál pontosabb az elválás a beteg és kontroll csoportok között.





**20. ábra:** RA% értéktől függően szignifikánsan eltérő glikánstruktúrák, a kontroll és appendicitis mintacsoportok közötti szeparációjának vizualizálása pair plot diagramon. A diagramon csak a Mann-Whitney teszt alapján szignifikáns és 0,5 értéktől magasabb RA%-kal rendelkező glikánok kerültek feltüntetésre.

A glikánok csoportelkülönítő szerepét ROC analízissel igazoltam (21. ábra), amiben csak a 0,85-nél nagyobb AUC-értékkel rendelkező glikánokat ábrázoltam, mint megbízható jelzőket. Az A2G2S1#19 és az A2BG3S2#31 glikán struktúrák magas AUC értékkel (0,98 és 0,97) és szűk konfidencia intervallummal (0,91-1 és 0,94-1 tartomány) jellemezték a kontroll csoportot (21. ábra A). Továbbá az A2G2S2#25 és A3G3S3#34 glikánok nagyfokú megbízhatósággal azonosítják az appendicitis betegek csoportját: AUC: 0,89 és 0,98; konfidencia tartomány: 0,79-0,99 és 0,94-1 (21. ábra B).



| Teszt<br>változó | AUC  | Std.<br>deviáció | Aszimptotikus<br>szignifikancia <sup>b</sup> | Aszimptotikus 99% -os konfidencia<br>intervallum |             |
|------------------|------|------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------|
|                  |      |                  |                                              | Alsó határ                                       | Felső határ |
| A2G2S1#19        | 0,98 | 0,02             | 0,001                                        | 0,94                                             | 1           |
| A2BG3S2#31       | 0,97 | 0,02             | 0,001                                        | 0,91                                             | 1           |
| M7#17            | 0,92 | 0,03             | 0,001                                        | 0,84                                             | 0,99        |
| FA2G2S2#24       | 0,88 | 0,04             | 0,001                                        | 0,78                                             | 0,97        |
| A3G3S3#34        | 0,98 | 0,02             | 0,001                                        | 0,94                                             | 1           |
| A2G2S2#25        | 0,89 | 0,04             | 0,001                                        | 0,79                                             | 0,99        |

a. Nemparaméteres feltételezés mellett

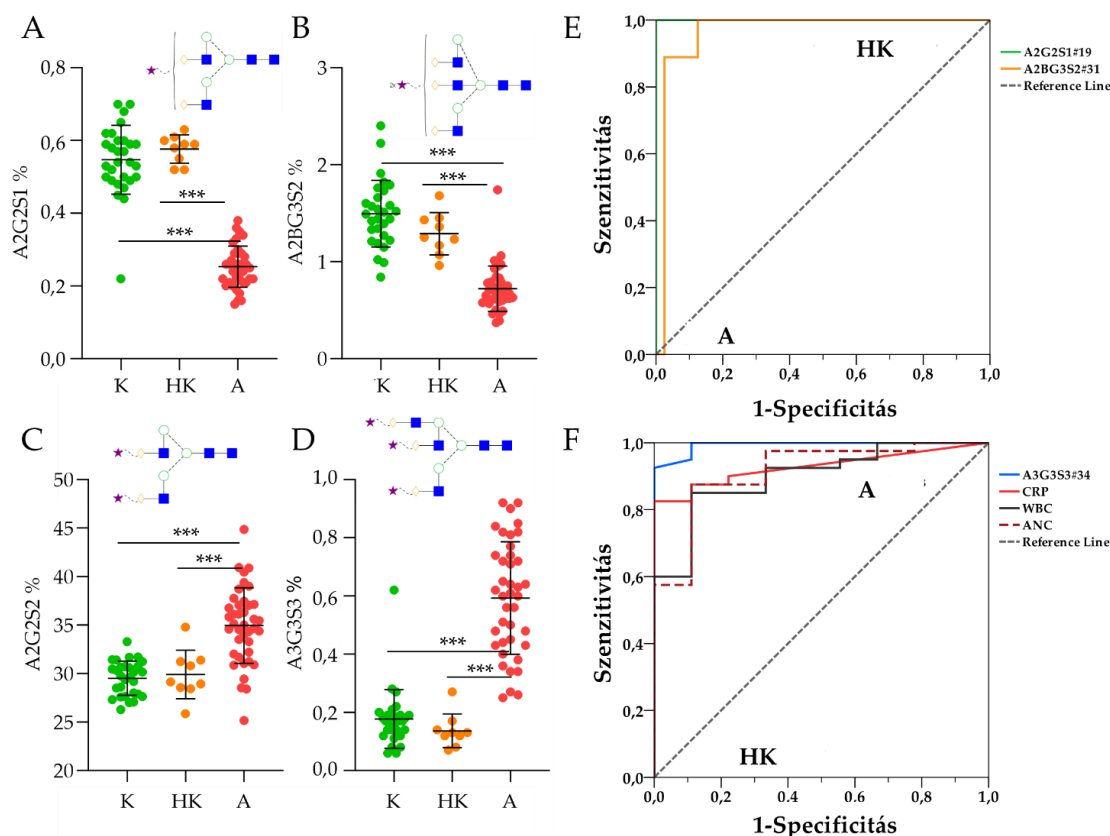
b. Nullhipotézis: a terület valódi értéke=0,5

**21. ábra:** ROC görbe analízis a kontroll és az appendicitis mintacsoportok között a szignifikánsan változott glikán struktúrákra nézve. Nullhipotézis:  $AUC=0,5$ . Megbízhatósági intervallum: 99%. A ROC görbe alatti táblázat összefoglalja az analízis AUC, std. deviáció, aszimptotikus szignifikancia, valamint a konfidencia intervallum alsó- és felső határának értékeit. A: A2G2S1#19 (RT: 22,44 perc;  $[1076,51]^{2+}$ ), A2BG3S2#31 (RT: 27,75 perc;  $[1404,63]^{2+}$ ), M7#17 (RT: 21,83 perc;  $[889,94]^{2+}$ ), FA2G2S2#24 (RT: 24,76 perc;  $[1295,09]^{2+}$ ), B: A3G3S3#34 (RT: 28,05 perc;  $[1550,18]^{2+}$ ), A2G2S2#25 (RT: 25,12 perc;  $[1222,06]^{2+}$ ).

### Három csoportos kiértékelés alapját képező statisztikai tesztek

A három csoportos összehasonlítás során a hasi fájdalommal (HK) rendelkező kontroll mintacsoport a tünetmentes kontroll csoporttól nem, míg a vakbélgyulladással diagnosztizált mintacsoporttól szignifikánsan különböző glikánmintázatot mutatott az afukozilált és szializált struktúrákra nézve.





| Teszt<br>változó | AUC  | Std.<br>deviáció | Aszimptotikus<br>szignifikancia <sup>b</sup> | Aszimptotikus 99%-os konfidencia<br>intervallum |             |
|------------------|------|------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------|
|                  |      |                  |                                              | Alsó határ                                      | Felső határ |
| A2G2S1#19        | 0,98 | 0,01             | 0,001                                        | 1,00                                            | 1,00        |
| A2BG3S2#31       | 0,96 | 0,03             | 0,001                                        | 0,91                                            | 1,00        |
| A3G3S3#34        | 0,99 | 0,01             | 0,001                                        | 0,97                                            | 1,00        |
| CRP              | 0,93 | 0,04             | 0,001                                        | 0,86                                            | 0,99        |
| WBC              | 0,90 | 0,05             | 0,001                                        | 0,80                                            | 0,99        |
| ANC              | 0,91 | 0,05             | 0,001                                        | 0,82                                            | 1,00        |

a. Nemparaméteres feltételezés mellett

b. Nullhipotézis: a terület valódi értéke=0,5

**22. ábra:** N-glikán biomarkerek diagnosztikai potenciálja gyermekkori vakbélgyulladásban. A - D: a normál kontroll (K), alhasi fájdalommal jelentkező kontroll (HK) és vakbélgyulladással diagnosztizált betegek (A) mintacsoportjainak összehasonlítása és a mintacsoportok közötti szignifikáns N-glikánok ábrázolása (Kruskal-Wallis teszt: 95% CI,  $p=0,01$ ). A: A2G2S1#19 (RT: 22,44 perc;  $[1076,51]^{2+}$ ;  $p<0,001$ ), B: A2BG3S2#31 (RT: 27,75 perc;  $[1404,63]^{2+}$ ;  $p<0,001$ ), C: A2G2S2#25 (RT: 25,12 perc;  $[1222,06]^{2+}$ ;  $p<0,001$ ), D: A3G3S3#34 (RT: 28,05 perc;  $[1550,18]^{2+}$ ;  $p<0,001$ ). \*\*\*: $p\leq 0,001$ ; E- F: ROC analízis vizualizációja a vakbélgyulladás (A) és alhasi fájdalommal jelentkező kontroll (HK) mintacsoportok között vizsgálva. Nullhipotézis: AUC=0,5. Megbízhatósági intervallum: 99%.

A korábbi megfigyelésekkel összhangban azt tapasztaltam, hogy az alhasi fájdalommal jelentkező kontroll csoporthoz képest is lecsökkent a monoszializált A2G2S1#19 (22. ábra A) és biszektilált A2BG3S2#31 (22. ábra B) glikánok szintje. Mindezek mellett nőtt a di-és triszializáltak szintje a vakbélgyulladásos betegcsoportban (A2G2S2#25 (22. ábra C) és A3G3S3#34 (22. ábra D)).

Az A2G2S1#19 és A2BG3S2#31 struktúrák a ROC analízisben 0,98 és 0,96 AUC értékekkel alátámasztva nagy megbízhatósággal jellemezték a HK csoportot (22. ábra E). Emellett a laborparaméterek, azaz CRP, WBC és ANC, valamint az A3G3S3#34 glikoforma RA%-nak predikciós teljesítménye jónak bizonyultak a vakbélgyulladás betegcsoport jellemzésére (22. ábra F). A ROC analízis eredményként 0,9 feletti AUC értékek és szűk tartományú konfidencia intervallum jellemezte az említett paramétereket (22. ábra táblázata).

Összességében a predikciós modellek és az egyes glikán struktúrákra meghatározott átlagos RA%-értékek alapján be tudtam sorolni a mintákat a beteg- vagy a kontroll csoportba. Például, ha az A2G2S1#19 átlagos RA%-a meghaladta a 0,44-et, és az A3G3S3#34 értéke 0,25 alatt maradt, a ROC görbe megbízhatóságának alátámasztásával az adott szérum minta a vakbélgyulladásos csoportba sorolható.

### 5.3. Eredmények megvitatása

A jelen disszertációban bemutatott eredmények két, egymással szorosan összefüggő területhez kapcsolódnak: egyrészt egy új, MNP-alapú N-glikán tisztítási eljárás fejlesztéséhez és analitikai értékeléséhez, másrészt a teljes szérum N-glikozilációs mintázatok gyulladásos betegségekben történő vizsgálatához. A következőkben ezen eredmények értelmezését és irodalmi kontextusba helyezését mutatom be.

#### 5.3.1. Újonnan szintetizált MNP-alapú glikán tisztítási protokoll fejlesztésének összefoglalása

A disszertációm 5.1. alpontjában bemutatott kísérletek célja NH<sub>2</sub>-funkcionalizált MNP-k glikán-tisztítási hatékonyságának optimalizálása, összehasonlítása és automatizálhatóságának vizsgálata volt.

- **Ferrit-alapú MNP-típusok összehasonlítása:** A különböző ferrit-alapú, NH<sub>2</sub>- funkcionális MNP-k összehasonlítása alapján a NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> típusú MNP bizonyult a leghatékonyabbnak N-glikánok megkötésére: alacsony CV, magas glikán intenzitás és alacsony SZFF intenzitás. Eredményeimet alátámasztja az 1. melléklet

1. táblázatában szereplő elemanalízis is, ami szerint a nitrogéntartalom a  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  esetében volt a legmagasabb. Ez a funkcionális  $\text{NH}_2$ -csoportok mennyiségére és egyben azok hozzáférhetőségére is utal, ami meghatározó a glikánok megkötése szempontjából, hiszen ezen keresztül jön létre a hidrofil kölcsönhatás a glikánmolekulákkal. Továbbá az MNP részecskekoncentráció tesztelése rámutatott arra, hogy a glikán megkötés hatékonysága nem javul a 4 mg/ml koncentráció felett. Ennek oka lehet, hogy rendszerben jelen lévő glikánmennyiséghez képest a kötőhelyek száma ezen a koncentráción már telítetté válik. Ebben az esetben a többlet MNP nem eredményez nagyobb megkötést, mivel a kötési reakció egyensúlya beáll, továbbá nagyobb részecskesűrűség mellett nő az aggregáció és csökken a hozzáférhető felület hatékonysága.

- **Diszperziós közegek optimalizálása:** Az MNP pipettázása során fellépő szedimentáció mérséklésére a 20× glikolos (G) és a 0,5 mg/ml vizes (V) közegek bizonyultak a hatékonyabbnak mivel mindkét esetben magasabb glikán intenzitást kaptam, mint a standardként alkalmazott 4 mg/ml  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  szárított (Sz) típusú MNP esetében. Ez egyértelműen azt mutatja, hogy az MNP szintézis során a szárítási lépés elhagyása mérsékelte a részecskék aggregációs hajlamát, így stabilabb és egyenletesebb kolloid diszperzió alakult ki. A kisebb mértékű aggregáció következtében nagyobb effektív felület és jobb glikán-hozzáférhetőség állt rendelkezésre, ami a glikán megkötési hatékonyság növekedését, azaz adszorpció körülményeinek hatékonyabbá tételét jelentette. A homogénabb részecskeeloszlás ezen felül a szuszpenzió a pipettázhatóságát is javította.
- **Elúciós pufferek összehasonlítása:** Milli-Q ultratiszta víz és 150 mM ammónium-formiát (pH 4,4) összehasonlításánál a 0,5 mg/ml koncentrációjú  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (V) MNP esetében nem jelentkezett szignifikáns különbség a két puffer között. Ez arra utal, hogy az elúció elsősorban fizikai deszorpció útján történik, és nem ioncserés mechanizmuson alapul.
- **Kereskedelmi forgalomban kapható készletekkel való összehasonlítás:** A  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (V) MNP alkalmazása felülmúlta a kereskedelmi forgalomban elérhető  $\text{CH}_3\text{CONH}_2$ -és  $\text{NH}_2$ -funkcionalizált centrifugális MonoSpin oszlopos készleteket is, mind a glikán, mind az SZFF intenzitás szempontjából. Emellett az előállított MNP-protokoll költséghatékonyabb megoldást kínál, hiszen a reagensek és az eszközigény jóval alacsonyabb, mint a kereskedelmi alternatíváké.

- **Automatizálhatóság tesztelése:** A módszer automatizálhatóságát a Hamilton MicroLab Prep folyadékkezelő platformon teszteltem, ahol a 0,5 mg/ml  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (V) MNP-protokoll sikeresen adaptálható volt. Ez lehetővé teszi a nagy mintaszámú N-glikozilációs kísérletek gyors és reprodukálható kivitelezését, valamint a jövőbeni automatizált glikoanalitikai folyamatokba való integrálását.

Eredményeim összhangban vannak korábbi megfigyelésekkel, amelyek szerint az amin-funkcionalizált mágneses nanorészecskék hatékonyan alkalmazhatók glikopeptidek megkötésére, mivel a glikánrész negatív töltésű hidroxil-, illetve szíalsavas glikánok esetén karboxilcsoportjai hidrofil és elektrosztatikus kölcsönhatást alakítanak ki a nanorészecske felszínén található  $\text{NH}_2$ -csoportokkal [103]. Azonban a legtöbb tanulmányban alkalmazott szilika vagy PEG bevonat több előállítási lépést és magasabb költségeket igényel, mint az általunk előállított, közvetlenül funkcionalizált  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  nanorészecskék [89, 95]. A hagyományos SPE- és HILIC-alapú oszlopos tisztítási eljárásokkal szemben a disszertációmban bemutatott MNP-alapú megközelítés további előnye, hogy nem igényel centrifugálási lépéseket vagy drága berendezéseket, és könnyen automatizálható folyadékkezelő robotokon. Ez jelentős megtakarítást jelent mind az eszközbeszerzés, mind a munkaidő-ráfordítás tekintetében. Végül, a költséghatékonysági szempontokat figyelembe véve, az MNP-alapú módszer jelentős előnyt biztosít a kutatócsoportunk számára nagy mintaszámú akár több száz mintát érintő glikán-tisztítási projektek kivitelezése során.

### 5.3.2. Teljes szérum N-glikozilációs vizsgálatok összefoglalása

A dolgozat 5.2. alpontban bemutatott teljes szérum N-glikozilációs vizsgálatok során három eltérő gyulladásos kórképet elemeztem, különböző mintacsoportosítási szempontok alapján. A kísérleteimben az eddigi irodalmi adatok kiegészítésével és új szempontok bevezetésével az SM esetében a minták nem szerinti csoportosítását, a COVID-19 kísérletben a Pfizer-BioNTech mRNS-alapú vakcináció hatását vizsgáltam, míg a vakbélgyulladásra irányuló kísérletekben először végeztem N-glikozilációs elemzést a betegség diagnosztikai elkülönítésének céljából. Ez utóbbi vizsgálatában olyan glikánalapú biomarker azonosítása volt a cél, amely képes megkülönböztetni a valódi vakbélgyulladást a hasi fájdalommal, de negatív diagnózissal felvett páciensektől, ami jelenleg diagnosztikai hiányosságot jelent. A kísérletek mintaelőkészítésében a már korábban bemutatott mintaelőkészítési lépéseket végeztem el, azonban a COVID-19 és a vakbélgyulladás mintacsoportokhoz  $\text{NH}_2$ -funkcionalizált centrifugális oszlopot alkalmaztam. Ennek oka,

hogyan az MNP-protokoll optimalizálása és a betegségek N-glikozilációs elemzése egyidejűleg zajlott, így nem tudtam az MNP-protokollt alkalmazni ezekben a kísérletekben. Az egyes kohortokat önállóan elemeztem, így betegségcsoportonként eltérő retenciós idővel azonosítottam a kromatogramokon megjelenő ugyanazon glikán csúcsokat.

Mindhárom kísérletben több mint 40 glikánt detektáltam, majd a fluoreszcens kromatogramok integrálásával meghatároztam az egyes glikánok RA% értékeit, amiket egészséges-és beteg mintacsoportonkénti összehasonlításokhoz használtam fel. A legfontosabb megfigyeléseket és glikozilációs változásokat az 6. táblázat foglalja össze.

**6. táblázat:** A teljes szérum N-glikozilációs mintázatainak összehasonlító áttekintése különböző betegségekben (sclerosis multiplex, COVID-19 és akut vakbélgyulladás)

| Betegség                | Glikoforma                                                            | Változás                                                                                   | Változás jelentősége                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| sclerosis multiplex     | Fukoziláció<br>(FA2G2S1#16,<br>FA2#1)                                 | csökkenés                                                                                  | A fukoziláció szignifikáns csökkenése a neutrálisabb cukroknál volt megfigyelhető, amik nagy százalékban az IgG-ről származnak, így akár gyulladásos mediátorok (pl. citokinek)                                                       |
|                         | Afukoziláció<br>(A2G2S1#21)<br>Biszektilált GlcNAc<br>(FA2BGS1#19)    | növekedés                                                                                  | hatására bekövetkező glikánbioszintézis-átprogramozódás eredménye lehet. A biszektiláció autoimmun betegségekben fokozhatja az immunválasz kialakulását.                                                                              |
| COVID-19                | Fukoziláció<br>(FA2G2S2#23)                                           | csökkenés<br>(minden csoporthoz képest<br>Covid+Oltás+ csoportban)                         | A fukoziláció és afukoziláció arányeltolódását az oltás és a fertőzés együtt módosíthatja a fukozil-transzferáz enzimek működését.                                                                                                    |
|                         | Szialisáció<br>(A2G2S1#13,<br>A2G2S2#21,<br>A3G3S3#38)                | szialsavak száma összefügg<br>a Covid+Oltás+ csoportban<br>való százalékos<br>növekedéssel | A szialisáció növekedése a citokin fehérje által vezérelt akut fázisú válaszhoz kapcsolódik, amely fokozza a szialil-transzferáz enzimek expresszióját.                                                                               |
| akut<br>vakbélgyulladás | Szialisáció<br>(A2G2S1#19,<br>A2BG3S2#31,<br>A2G2S2#25,<br>A3G3S3#34) | monoszialisáltság és<br>biszekció csökkenés,<br>di-és triszialisáltság<br>növekedés        | A szialisációs fok növekedése és a biszektilált GlcNAc csökkenése az akut fázisú, citokin vezérelt glikozilációs átrendeződésre utal, amelyben a glikánok inkább magasabb fokú szialisációt kapnak, miközben a biszekció visszaszorul |

Eredményeim kiegészítik a korábbi megfigyeléseket az érintett betegségek kapcsán, valamint segítenek megérteni a betegségek sejtszintű mechanizmusát. Az SM jelenlegi diagnosztikai gyakorlata elsősorban a rutinszerűen alkalmazott MRI vizsgálatra, valamint

cerebrospinális folyadékból kimutatott oligoklonális IgG sávok azonosítására épül. Az irodalmi adatok alapján azonban ez a diagnosztikai paletta hasznosan kiegészíthető lenne mind a szérumban glikoproteinek N-glikozilációs mintázatának vizsgálatával [51, 114]. Az értekezésben bemutatott eredmények arra utalnak, hogy az SM-ben megfigyelt glikozilációs eltérések nem specifikus mutatókat mutatnak, különösen a fukoziláció összefüggésében. A fukoziláció szignifikáns csökkenése a neutrálisabb cukroknál volt megfigyelhető, amik nagy százalékban az IgG-ről származnak, és gyakran a gyulladásos mediátorok (pl. citokinek) által kiváltott glikán-bioszintézis átprogramozódásának következményei [23]. A biszektiláció növekedése pedig jellemzően, az autoimmun betegségeknél fokozhatja az immunválasz kialakulását [115].

A COVID-19 esetében a korábbi tanulmányok döntően a fertőzés súlyosságával, a betegség lefolyásával és az akut immunválasz jellemzőivel hozták összefüggésbe a fertőzéshez kapcsolódó N-glikozilációs változásokat, míg a vakcináció önálló hatásmechanizmusát és a posztinfekciós glikánmintázatok alakulását kevésbé vizsgálták [21, 63-65]. A dolgozatomban bemutatott eredmények alapján a fukoziláció és afukoziláció ellentétes irányú változása arra utal, hogy fukozil-transzferáz enzimek expressziója megváltozott a Pfizer-BioNTech mRNS-vakcina hatására, a fertőzésen átesettek körében. A szializáció mértéke szoros összefüggést mutatott a fertőzésen átesettek csoportjában az oltottsággal, ami feltételezi, hogy a Pfizer-BioNTech mRNS-vakcina hatására módosult a szérumban N-glikánmintázat a nem fertőzött és nem oltott mintacsoportokhoz képest. Az interleukin-6, mint egy jelátvivő citokin fehérje által vezérelt akut fázisú válasz során fokozódik a szialil-transzferáz enzimek expressziója, amit COVID-19 fertőzés esetén a vakcináció és a korábbi fertőzés immunológiai hatásai együtt alakítottak ki [63]. Ez átfedésben van a korábban is kimutatott teljes plazma N-glikánmintázatában megfigyeltekkel, miszerint a COVID-19 fertőzés során nő az antennaritás aránya, főként az  $\alpha$ 2,6-szializált glikánok esetében, miközben a biszektiláció és a magfukoziláció csökken [68, 69].

Irodalmi adatok szerint akut gyulladás során számos májban termelődő akut fázisfehérje, mint például az  $\alpha$ 1-savanyú glikoprotein vagy az  $\alpha$ 1-antitripszin, kifejezett N-glikozilációs változásokat mutat, melyre főképp a szialosavak diantennás struktúrák megjelenésének fokozódása jellemző [56]. Ez összhangban van a jelen vizsgálatban megfigyelt di- és triszializált glikánok arányának növekedésével a gyermekkori vakbélgyulladásban. Az A2G2S1#19, A2BG3S2#31, A2G2S2#25 és A3G3S3#34 glikánok erősen korreláltak a betegség jelenlétével. A monoszializált (A2G2S1#19) és biszektilált

(A2BG3S2#31) struktúrák szintje csökkent, míg a di- és triszializált glikánoké (A2G2S2#25, A3G3S3#34) emelkedett az vakbélgyulladásban. A semleges glikánok alacsonyabb szintje és a szializált struktúrák magasabb aránya jelentősen hozzájárult a vakbélgyulladásos betegek és kontrollok elkülönítéséhez. Az A2G2S1#19 ( $RA\% > 0,44$ ) és A3G3S3#34 ( $RA\% < 0,25$ ) küszöbértékek együttes alkalmazása magas megbízhatósággal azonosította a vakbélgyulladásos eseteket. A laborparaméterekkel (CRP, WBC, ANC) kombináltan az A3G3S3#34 kiváló prediktív teljesítményt mutatott. A vakbélgyulladásban megfigyelt magasabb szializációs fok összhangban van a gyulladás hatására termelődött citokinek glikozilációra mért hatásával [59]. A citokinek túltermelődése miatt szialil-transzferáz enzimek fokozottan expresszálódnak, így a glikánok inkább magasabb fokú szializációt kapnak, miközben például a biszekció, fukoziláció visszaszorul [1].

Összességében a teljes szérum N-glikozilációs mintázatok vizsgálata olyan komplex molekuláris rendszerek szerkezeti és mennyiségi változásait tárta fel, amelyek érzékenyen reagálnak a gyulladásos állapotok során bekövetkező kémiai és enzimatisz környezet változásokra. A disszertáció első részében kidolgozott, mágneses nanorészecske-alapú N- glikán tisztítási eljárás megfelelő szelektivitást, reprodukálhatóságot és automatizálhatóságot biztosított ezen összetett mintázatok nagy mintaszámú analitikai vizsgálatához. Az alkalmazási eredmények azt mutatják, hogy a módszerfejlesztés során optimalizált nanoméretű felületi kölcsönhatások nemcsak analitikai szempontból hatékonyak, hanem lehetővé teszik a biológiai eredetű komplex rendszerek strukturált, kvantitatív jellemzését, ami megalapozza az N-glikoziláció anyagtudományi és bioanalitikai megközelítésű értelmezését.

## 6. Összefoglalás

Az N-glikoziláció a fehérjékhez kapcsolódó, kovalens szerkezeti módosítás, amelynek szerkezeti felépítése és relatív eloszlása érzékenyen reagál a rendszer állapotának változásaira, így alkalmas gyulladásos és egyéb kóros folyamatok molekuláris jellemzésére. A kutatás központi célja egy új, mágneses nanorészecske (MNP) alapú N-glikán-tisztítási protokoll kidolgozása és optimalizálása volt, különösképpen a módszer szelektivitására, reprodukálhatóságára és analitikai alkalmazhatóságára. A módszerfejlesztés mellett teljes szérum N-glikozilációs mintázatok analitikai vizsgálatát végeztem el sclerosis multiplex (SM), COVID-19 és akut vakbélgyulladás mintaszettekben. A mintákból felszabadított és fluoreszcensen jelölt N-glikánok mintázatát MNP-vagy centrifugális oszlop alapú tisztítás után hidrofil kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfiát fluoreszcens detektálással és tömegspektrometriával kapcsolva (HILIC-UHPLC-FLD-MS) alkalmaztam a glikozilációs mintázatok elemzésére.

A disszertációban részletesen bemutattam az MNP-alapú N-glikán-tisztítási protokoll fejlesztését és optimalizálását. A különböző ferrit-alapú, NH<sub>2</sub>-funkcionalizált MNP-k összehasonlítása során megállapítottam, hogy a NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> MNP kiemelkedő glikánmegkötési teljesítményt mutat. A további optimalizálási lépések eredményeként egy 0,5 mg/mL koncentrációjú, vizes diszperziós közegben alkalmazott MNP-protokoll került kialakításra, amely magas glikánvisszanyerést, jó reprodukálhatóságot és alacsony szórást biztosított. Az eljárás felülmúlta a kereskedelmi centrifugális oszlopos módszereket, mind teljesítmény, mind költséghatékonyság tekintetében, és sikeresen integrálható volt automatizált folyadékkezelő platformra, lehetővé téve nagy mintaszámú vizsgálatok kivitelezését.

Továbbá teljes szérum N-glikozilációs mintázatok változásait elemeztem gyulladásos betegségekben. Sclerosis multiplexben nemi specifikus eltéréseket azonosítottam, különösen a fukoziláció és biszektiláció vonatkozásában. COVID-19 esetében a fertőzés és az mRNS-alapú vakcináció együttesen befolyásolta az N-glikozilációs mintázatokot, ahol a szializáció és fukoziláció arányai bizonyultak meghatározó elkülönítő tényezőknek. Gyermekkori akut vakbélgyulladásban a monoszializáció csökkent, míg a triszializáció emelkedett aránya meghatározott glikánstruktúrákra vonatkozó küszöbértékek jelentős diagnosztikai potenciált mutattak, különösen a rutin laborparaméterekkel kombinálva.



Összességében az MNP-alapú eljárás gyors, egyszerű és költséghatékony alternatívát kínál a glikán-mintaelőkészítésben, valamint alkalmas lehet nagymintaszámú klinikai vizsgálatokhoz, automatizált felhasználhatósága révén. Emellett a feltárt N-glikozilációs mintázatbeli eltérések a SM, COVID-19 és gyermekkori akut vakbélgyulladás betegségekben hozzájárulhatnak a vizsgált betegségek patomechanizmusának megértéséhez és potenciális kiegészítő diagnosztikai lehetőségeket nyújthatnak.

## 7. Summary

N-glycosylation is a covalent structural modification of proteins, the structural composition and relative distribution of which respond sensitively to changes in the physiological state of the system, making it suitable for the molecular characterization of inflammatory and other pathological processes. One of the main objectives of this dissertation was the development and optimization of a novel magnetic nanoparticle (MNP)-based N-glycan purification protocol, with particular emphasis on the selectivity, reproducibility, and analytical applicability of the method. In addition to method development, analytical investigations of total serum N-glycosylation patterns were performed in sample sets from multiple sclerosis (MS), COVID-19, and acute appendicitis. Following enzymatic release and fluorescent labeling, N-glycan profiles were analyzed after MNP-based or centrifugal column-based purification using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with fluorescence detection and mass spectrometry (HILIC- UHPLC-FLD-MS).

In the first part of the dissertation, the development and optimization of the novel MNP-based N-glycan purification protocol are described in detail. Through the comparative evaluation of various ferrite-based, NH<sub>2</sub>-functionalized MNPs, NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> MNPs were identified as exhibiting superior glycan-binding performance. Subsequent optimization resulted in an MNP protocol employing a concentration of 0,5 mg/mL in an aqueous dispersion medium, which provided high glycan recovery, good reproducibility, and low variability. The developed procedure outperformed commercially available centrifugal column-based methods in terms of both analytical performance and cost-effectiveness, and was successfully integrated into an automated liquid-handling platform, enabling the efficient processing of large sample cohorts.

In the second part of the dissertation, alterations in total serum N-glycosylation patterns were investigated in inflammatory diseases. In multiple sclerosis, sex-specific differences were identified, particularly with respect to fucosylation and bisecting GlcNAc-containing structures. In COVID-19, N-glycosylation patterns were influenced by the combined effects of infection and mRNA-based vaccination, with sialylation and fucosylation ratios emerging as key discriminating factors. In pediatric acute appendicitis, reduced monosialylation and the elevated level of trisialylation, together with defined threshold values for specific glycan structures, demonstrated significant diagnostic potential, especially when combined with routine laboratory parameters.

Overall, the MNP-based workflow offers a rapid, simple and cost-effective alternative for N-glycan sample preparation and, due to its compatibility with liquid-handling robotic platform, it is suitable for large-scale clinical studies. The disease-associated N-glycosylation changes in multiple sclerosis, COVID-19 and pediatric acute appendicitis may contribute to an improved understanding of the underlying pathophysiology and may support complementary diagnostic approaches.

## 8. Új tudományos eredmények

1. A  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  típusú MNP a vizsgált ferrit rendszerekhez képest hatékonyabb N-glikán adszorpció alapú mintaelőkészítést biztosít szérumból származó N-glikánok tisztítása során, amely új mágneses anyag bevezetését jelenti a glikán analízis mintaelőkészítésben.
2. A  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  típusú mágneses nanorészecskék vizes diszperziós közege és 0,5 mg/ml koncentrációja optimális feltételeket biztosít a glikánok hatékony adszorpciós megkötéséhez. Az így kialakított mintaelőkészítési protokoll mind költséghatékonyság, mind adszorpciós teljesítmény tekintetében felülmúlja a kereskedelmi forgalomban elérhető  $\text{CH}_3\text{CONH}_2$ - és  $\text{NH}_2$ -funkcionalizált centrifugális oszlopokat szérumból származó N- glikánok megkötése során.
3. A 0,5 mg/ml koncentrációjú vizes diszperziós közegű MNP-alapú N-glikán tisztítási protokoll implementálható folyadékkezelő robotikus platformra, úgy, hogy az automatizált műveletek mellett a variancia és a megkötési hatékonyság stabilan reprodukálható marad.
4. A Pfizer-BioNTech mRNS-alapú vakcináció szignifikáns N-glikozilációs mintaváltozást kizárólag a COVID-19 fertőzésen átesett egyének esetében eredményez. Mindezt a fukoziláció szignifikáns csökkenése, valamint az afukozilált, magas szíálsavtartalmú glikánstruktúrák szializáltsági fokának szignifikáns növekedése jellemzi.
5. Gyermekkori akut vakbélgyulladásban az integrált adatelemzési módszerek alkalmazása erős és szignifikáns korrelációt igazol a klinikai paraméterek (CRP, abszolút neutrofilszám, fehérvérsejtszám) és a szérum N-glikánstruktúrák között. A vakbélgyulladásos és a nem specifikus hasi fájdalommal járó mintacsoportok a szérum glikoproteineket jellemző N- glikán szializációs fok alapján elkülönülnek.

## 9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Váradi Csaba egyetemi docensnek, aki tudásával és tapasztalatával segítette tudományos fejlődésemet. Hálával tartozom a Miskolci Egyetem Kémia Intézetének és FIEK Intézetének igazgatójának, Prof. Dr. Viskolcz Bélának, amiért lehetőséget biztosított a doktori képzésemhez, és helyet adott a FIEK intézetében a munkatársak közösségében. Hálás vagyok a Kémia Intézetben egyetemi docensként dolgozó, Dr. Vanyorek Lászlónak és PhD hallgatójának, Ilosvai Mária Ágnesnek, amiért biztosítottak számomra mágneses nanorészecskéket, valamint segítettek azok szintézis eljárásának elsajátításában. Továbbá köszönöm Dr. Szőri-Dorogházi Emma, egyetemi docensnek a négy éven át nyújtott lelkes és alapos bírálati észrevételeit, amelyek nagyban hozzájárultak kutatószemináriumi dolgozataim és így a disszertációm fejlődéséhez és létrejöttéhez. Köszönöm mindazoknak a munkatársaimnak, akik akár tudományos, akár adminisztratív oldalról hozzájárultak kutatásaim előrehaladásához. Külön köszönet illeti a Doktori Iskola ügyintézőit, akik munkájukkal a doktori képzés adminisztratív terheit a kezdetektől a védésig jelentősen megkönnyítették.

Végezetül szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak a folyamatos támogatást, biztatást, amellyel végigkísértek ezen az úton. Külön hálával tartozom kolléga-barátnőmnek, aki megértésével, humorával és bátorításával mindig képes volt felvidítani a nehezebb pillanatokban is. Köszönet végezetül a férjemnek, aki napról napra jobban megértett és segített, hogy a fokozatszerzésig eljussak.

## 10. Értekezés alapjául szolgáló közlemények

- [1] Dojcsák, D., Farkas, F., Farkas, T., Papp, J., Garami, A., Viskolcz, B., & Váradi, C. (2024). The Impact of Protein Glycosylation on the Identification of Patients with Pediatric Appendicitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(12), 6432. <https://doi.org/10.3390/ijms25126432>
- [2] Dojcsák, D., Kardos, Z., Szabó, M., Oláh, C., Körömi, Z., Viskolcz, B., & Váradi, C. (2023). The Alterations of Serum N-glycome in Response to SARS-CoV-2 Vaccination. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6203. <https://doi.org/10.3390/ijms24076203>
- [3] Dojcsák, D., Ilosvai, Á. M., Vanyorek, L., Gilányi, I., Oláh, C., Horváth, L., & Váradi, C. (2022). NH<sub>2</sub>-Functionalized Magnetic Nanoparticles for the N-Glycomic Analysis of Patients with Multiple Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9095. <https://doi.org/10.3390/ijms23169095>

## 11. További, referált folyóiratokban megjelent közlemények

- [1] Dojcsák, D., & Váradi, C. (2024). N-glycosylation studies in infectious disease using high-resolution analytical methods. In *XXX. Nemzetközi Vegyészkonferencia* (p. 19).
- [2] Dojcsák, D., & Váradi, C. (2024). Mágneses nanorészecske alapú glikán tisztítási protokoll optimalizálása: Hatékonyság és specificitás javítása mágneses nanorészecskék alkalmazásával. *Doktorandusz Almanach, I*, 140–150.
- [3] Dojcsák, D., Farkas, F., Farkas, T., Papp, J., Garami, A., Viskolcz, B., & Váradi, C. (2024). Humán vérszérum glikozilációs vizsgálata gyermekkori vakbélgyulladásban magasnyomású folyadékkromatográfiával és tömegspektrometriával. *Doktorandusz Almanach, I*, 179–188.
- [4] Tóth, M., Varga, L., Molnár, P., Oláh, Zs., Baksa-Varga, E., Oláh, B., Dojcsák, D., Némethy, S., & Oláh, Cs. (2024). Prospective clinical study of the effects of small amounts of Aszu Wine on psychosomatic health. In S. Némethy & M. Kreidlmayer (Eds.), *Tokaj Wine Congress 2024: Book of Abstracts* (p. 78). Sárospatak, Magyarország: University of Tokaj, University of Debrecen.

[5] Dojcsák, D., & Váradi, C. (2022). Mágneses nanorészecskék fejlesztése és alkalmazása glikoanalízis céljából. *Doktorandusz Almanach, 1*, 92–101.

[6] Ilosvai, Á. M., Dojcsák, D., Váradi, C., Nagy, M., Kristály, F., Fiser, B., Viskolcz, B., & Vanyorek, L. (2022). Sonochemical combined synthesis of nickel ferrite and cobalt ferrite magnetic nanoparticles and their application in glycan analysis. *International Journal of Molecular Sciences, 23*(9), 5081

## **12. További, nem referált folyóiratban megjelent közlemény**

[1] Dojcsák, D., & Váradi, C. (2024). Optimization of magnetic nanoparticle-based glycan purification protocol: Enhancing efficiency and specificity using magnetic nanoparticles. In D. Mentés, A. Jordán, L. Farkas, B. Fiser, P. Mizsey, & B. Viskolcz (Eds.), *Symposium on Polymer(s) Innovation 2024 & Energy, Mitigation, Storage: Conference booklet* (pp. 52–60). Miskolc, Magyarország: Miskolci Egyetem, Felsőoktatási és Ipari Együttműködési Központ.

### 13. Irodalomjegyzék

1. de Haan, N.; Nielsen, M. I.; Wandall, H. H. Reading and Writing the Human Glycocode. *Annu. Rev. Biochem.*, 2024, 93, 529–564.
2. Scheper, A. F., et al. Understanding glycosylation: Regulation through the metabolic flux of precursor pathways. *Biotechnol. Adv.*, 2023, 67, 108184.
3. Potel, C. M., et al. Uncovering protein glycosylation dynamics and heterogeneity using deep quantitative glycoproteomics (DQglyco). *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2025, 32(6), 1111–1126.
4. Spiro, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 2002, 12(4), 43R–56R.
5. Rabinovich, G. A.; Toscano, M. A. Turning “sweet” on immunity: galectin–glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, 9(5), 338–352.
6. Cindrić, A.; Pribić, T.; Lauc, G. High-throughput N-glycan analysis in aging and inflammaging: State of the art and future directions. *Semin. Immunol.*, 2024, 73, 101890.
7. Mariño, K., et al. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nat. Chem. Biol.*, 2010, 6(10), 713–723.
8. Trbojević-Akmačić, I., et al. High-Throughput Glycomics Methods. *Chem. Rev.*, 2022, 122(20), 15865–15913.
9. Filep, C., et al. N-glycosylation analysis of biopharmaceuticals by multicapillary gel electrophoresis: Generation and application of a new glucose unit database. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2020, 178, 112892.
10. Gornik, O.; Keser, T.; Lauc, G. Separation and Purification of Glycans Out of Glycoproteins. In *Sample Preparation Techniques for Soil, Plant, and Animal Samples*; Micic, M., Ed.; Springer: New York, NY, 2016; pp 377–388.
11. Váradi, C.; Lew, C.; Guttman, A. Rapid Magnetic Bead Based Sample Preparation for Automated and High Throughput N-Glycan Analysis of Therapeutic Antibodies. *Anal. Chem.*, 2014, 86(12), 5682–5687.
12. Wan, C., et al. Cellulose functionalized magnetic beads for high throughput glycosylation analysis in biotherapeutic modalities. *Sci. Rep.*, 2024, 14(1), 29735.



13. Austria, E. S.; Lamorena, R. B.; Arco, S. D. Synthesis and functionalization of magnetic nanoparticles for glycoprotein and glycopeptide enrichment: A review. *Microchem. J.*, 2024, 201, 110663.
14. Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D., et al. *Essentials of Glycobiology*, 4th ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 2022.
15. Varki, A. Biological roles of glycans. *Glycobiology*, 2016, 27(1), 3–49.
16. Pongracz, T.; Mayboroda, O. A.; Wuhler, M. The Human Blood N-Glycome: Unraveling Disease Glycosylation Patterns. *JACS Au*, 2024, 4(5), 1696–1708.
17. Murray, T. J. The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *J. Neurol. Sci.*, 2009, 277, S3–S8.
18. Gizaw, S. T., et al. Glycoblotting method allows for rapid and efficient glycome profiling of human Alzheimer’s disease brain, serum and cerebrospinal fluid towards potential biomarker discovery. *BBA – Gen. Subj.*, 2016, 1860(8), 1716–1727.
19. Clerc, F., et al. Plasma N-Glycan Signatures Are Associated With Features of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 2018, 155(3), 829–843.
20. Dotz, V.; Wuhler, M. N-glycome signatures in human plasma: associations with physiology and major diseases. *FEBS Lett.*, 2019, 593(21), 2966–2976.
21. Bladergroen, M. R., et al. Total plasma N-glycomic signature of SARS-CoV-2 infection. *iScience*, 2024, 27(7), 110374.
22. Hirata, T.; Kizuka, Y. N-Glycosylation. In *The Role of Glycosylation in Health and Disease*; Lauc, G.; Trbojević-Akmačić, I., Eds.; Springer: Cham, 2021; pp 3–24.
23. Schjoldager, K. T., et al. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2020, 21(12), 729–749.
24. Visconti, P. E.; Florman, H. M. Mechanisms of Sperm-Egg Interactions: Between Sugars and Broken Bonds. *Sci. Signal.*, 2010, 3(142), pe35.
25. Pereira, M. S., et al. Glycans as Key Checkpoints of T Cell Activity and Function. *Front. Immunol.*, 2018, 9, (2018).
26. Clerc, F., et al. Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj. J.*, 2016, 33(3), 309–343.
27. Fan, Y., et al. Loss and gain of N-linked glycosylation sequons due to single-nucleotide variation in cancer. *Sci. Rep.*, 2018, 8(1), 4322.
28. de Haan, N., et al. Glycomics studies using sialic acid derivatization and mass spectrometry. *Nat. Rev. Chem.*, 2020, 4(5), 229–242.

29. Varki, A., et al., Eds. *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 2009.
30. Varki, A., et al. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. *Glycobiology*, 2015, 25(12), 1323–1324.
31. Thieker, D. F., et al. 3D implementation of the symbol nomenclature for graphical representation of glycans. *Glycobiology*, 2016, 26(8), 786–787.
32. Struwe, W. B., et al. GlycoMob: an ion mobility-mass spectrometry collision cross section database for glycomics. *Glycoconj. J.*, 2016, 33(3), 399–404.
33. Tiemeyer, M., et al. GlyTouCan: an accessible glycan structure repository. *Glycobiology*, 2017, 27(10), 915–919.
34. Ceroni, A., et al. GlycoWorkbench: A Tool for the Computer-Assisted Annotation of Mass Spectra of Glycans. *J. Proteome Res.*, 2008, 7(4), 1650–1659.
35. Lee, H. S.; Qi, Y.; Im, W. Effects of N-glycosylation on protein conformation and dynamics: Protein Data Bank analysis and molecular dynamics simulation study. *Sci. Rep.*, 2015, 5(1), 8926.
36. Lado-Baleato, Ó., et al. Age-Related Changes in Serum N-Glycome in Men and Women—Clusters Associated with Comorbidity. *Biomolecules*, 2024, 14(1), 17.
37. Dall'Olio, F., et al. N-glycomic biomarkers of biological aging and longevity: A link with inflammaging. *Ageing Res. Rev.*, 2013, 12(2), 685–698.
38. Krištić, J., et al. Glycans Are a Novel Biomarker of Chronological and Biological Ages. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 2013, 69(7), 779–789.
39. Liao, C., et al. FUT8 and Protein Core Fucosylation in Tumours: From Diagnosis to Treatment. *J. Cancer*, 2021, 12(13), 4109–4120.
40. Chen, Z., et al. Recognition of Core-Fucosylated Glycopeptides Based on the Y1+Fuc/Y1 Ratio in Low-Energy HCD Spectra. *Anal. Chem.*, 2022, 94(50), 17349–17353.
41. Lauc, G. Precision medicine that transcends genomics: Glycans as integrators of genes and environment. *BBA – Gen. Subj.*, 2016, 1860(8), 1571–1573.
42. Ashkani, J.; Naidoo, K. J. Glycosyltransferase Gene Expression Profiles Classify Cancer Types and Propose Prognostic Subtypes. *Sci. Rep.*, 2016, 6(1), 26451.
43. Yamamoto, M., et al. Expression profiling of 68 glycosyltransferase genes in 27 different human tissues... *Electrophoresis*, 2003, 24(14), 2295–2307.
44. Royle, L., et al. HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform... *Anal. Biochem.*, 2008, 376(1), 1–12.

45. Knežević, A., et al. Variability, Heritability and Environmental Determinants of Human Plasma N-Glycome. *J. Proteome Res.*, 2009, 8(2), 694–701.
46. Reily, C., et al. Glycosylation in health and disease. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2019, 15(6), 346–366.
47. Reiding, K. R., et al. Serum Protein N-Glycosylation Changes with Rheumatoid Arthritis Disease Activity during and after Pregnancy. *Front. Med.*, 2018, 4, (2017).
48. Mayboroda, O. A., et al. An Integrated Glycosylation Signature of Rheumatoid Arthritis. *Biomolecules*, 2023, 13(7).
49. Pongracz, T., et al. Autoimmune hepatitis displays distinctively high multi-antennary sialylation on plasma N-glycans... *J. Transl. Med.*, 2024, 22(1), 456.
50. Decker, Y., et al. Abnormal galactosylation of immunoglobulin G in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Mult. Scler. J.*, 2016, 22(14), 1794–1803.
51. Wuhrer, M., et al. Pro-inflammatory pattern of IgG1 Fc glycosylation in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J. Neuroinflammation*, 2015, 12(1), 235.
52. Thompson, A. J., et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.*, 2018, 17(2), 162–173.
53. Cvetko, A., et al. Glycosylation Alterations in Multiple Sclerosis Show Increased Proinflammatory Potential. *Biomedicines*, 2020, 8(10), 410.
54. Kennedy, P. G. E., et al. Aberrant Immunoglobulin G Glycosylation in Multiple Sclerosis. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 2022, 17(1–2), 218–227.
55. Lai, Z., et al. Disease-Specific haptoglobin N-Glycosylation in inflammatory disorders... *Clin. Chim. Acta*, 2023, 547, 117420.
56. McCarthy, C., et al. The Role and Importance of Glycosylation of Acute Phase Proteins... *J. Proteome Res.*, 2014, 13(7), 3131–3143.
57. Reiding, K. R., et al. Human Plasma N-glycosylation... associates with markers of inflammation and metabolic health. *Mol. Cell. Proteomics*, 2017, 16(2), 228–242.
58. Irvine, E. B.; Alter, G. Understanding the role of antibody glycosylation... *Glycobiology*, 2020, 30(4), 241–253.
59. Gudelj, I., et al. Changes in total plasma and serum N-glycome composition... *Sci. Rep.*, 2016, 6(1), 31234.
60. Hiscott, J., et al. The global impact of the coronavirus pandemic. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2020, 53, 1–9.
61. Bian, J.; Li, Z. ACE2: SARS-CoV-2 receptor and RAS modulator. *Acta Pharm. Sin. B*, 2021, 11(1), 1–12.

62. Ying, B., et al. Protective activity of mRNA vaccines against ancestral and variant SARS-CoV-2 strains. *Sci. Transl. Med.*, 2022, 14(630), eabm3302.
63. Beimdiek, J., et al. Plasma markers of COVID-19 severity: a pilot study. *Respir. Res.*, 2022, 23(1), 343.
64. Bye, A. P., et al. Aberrant glycosylation of anti-SARS-CoV-2 spike IgG is a prothrombotic stimulus for platelets. *Blood*, 2021, 138(16), 1481–1489.
65. Van Coillie, J., et al. Comparative analysis of spike-specific IgG Fc glycoprofiles... *iScience*, 2023, 26(9), 107619.
66. Xie, Y.; Butler, M. Serum N-glycomic profiling may provide potential signatures for surveillance of COVID-19. *Glycobiology*, 2022, 32(10), 871–885.
67. Haroun, R. A.-H.; Osman, W. H.; Eessa, A. M. Evaluation of serum total sialic acid in moderate COVID-19 patients... *Tissue Cell*, 2022, 74, 101679.
68. Pongracz, T., et al. Immunoglobulin G1 Fc glycosylation as an early hallmark of severe COVID-19. *eBioMedicine*, 2022, 78.
69. Pongracz, T.; Vidarsson, G.; Wuhrer, M. Antibody glycosylation in COVID-19. *Glycoconj. J.*, 2022, 39(3), 335–344.
70. Sarrats, A., et al. Glycosylation of liver acute-phase proteins in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Proteomics Clin. Appl.*, 2010, 4(4), 432–448.
71. Gornik, O.; Lauc, G. Glycosylation of Serum Proteins in Inflammatory Diseases. *Dis. Markers*, 2008, 25(4–5), 493289.
72. Duarte-Rey, C., et al. IgM predominance in autoimmune disease: genetics and gender. *Autoimmun. Rev.*, 2012, 11(6–7), A404–A412.
73. Vreeker, G. C. M., et al. Automated Plasma Glycomics with Linkage-Specific Sialic Acid Esterification... *Anal. Chem.*, 2018, 90(20), 11955–11961.
74. Ruhaak, L. R., et al. Optimized Workflow for Preparation of APTS-Labeled N-Glycans... *J. Proteome Res.*, 2010, 9(12), 6655–6664.
75. Váradi, C., et al. The Analysis of Human Serum N-Glycosylation in Patients with Primary and Metastatic Brain Tumors. *Life*, 2021, 11(1), 29.
76. van der Zon, A. A. M., et al. Hydrophilic Interaction Chromatography HRMS with Acrylamide Monolithic Columns... *Anal. Chem.*, 2025.
77. Nicolardi, S., et al. Mapping O-glycosylation of apolipoprotein C-III in MALDI-FT-ICR protein profiles. *Proteomics*, 2013, 13(6), 992–1001.

78. Falck, D., et al. High-Throughput Analysis of IgG Fc Glycopeptides by LC-MS. In *High-Throughput Glycomics and Glycoproteomics: Methods and Protocols*; Lauc, G.; Wührer, M., Eds.; Springer: New York, NY, 2017; pp 31–47.
79. Piovesana, S., et al. Recent trends in glycoproteomics by characterization of intact glycopeptides. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2023, 415(18), 3727–3738.
80. Bones, J., et al. Ultra Performance Liquid Chromatographic Profiling of Serum N-Glycans... *Anal. Chem.*, 2010, 82(24), 10208–10215.
81. Pučić, M., et al. High Throughput Isolation and Glycosylation Analysis of IgG... *Mol. Cell. Proteomics*, 2011, 10(10).
82. Ahn, J., et al. Separation of 2-aminobenzamide labeled glycans... *J. Chromatogr. B*, 2010, 878(3–4), 403–408.
83. Neue, U. D., et al. Ultra-performance liquid chromatography technology and applications. *Adv. Chromatogr.*, 2010, 48, 99–143.
84. Wilson, I. D., et al. High Resolution “Ultra Performance” Liquid Chromatography Coupled to oa-TOF MS... *J. Proteome Res.*, 2005, 4(2), 591–598.
85. Keser, T., et al. Comparison of 2-Aminobenzamide, Procainamide and RapiFluor-MS... *Front. Chem.*, 2018, 6, (2018).
86. Tarentino, A. L.; Gomez, C. M.; Plummer, T. H., Jr. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by PNGase F. *Biochemistry*, 1985, 24(17), 4665–4671.
87. Ruhaak, L. R., et al. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 397(8), 3457–3481.
88. Selman, M. H. J., et al. Cotton HILIC SPE Microtips for Microscale Purification... *Anal. Chem.*, 2011, 83(7), 2492–2499.
89. Váradi, C., et al. Purification of Fluorescently Derivatized N-Glycans by Magnetic Iron Nanoparticles. *Nanomaterials*, 2019, 9(10), 1480.
90. Issa, B., et al. Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, 14(11), 21266–21305.
91. Nejati, K.; Zabihi, R. Preparation and magnetic properties of nano size nickel ferrite particles... *Chem. Cent. J.*, 2012, 6(1), 23.
92. Gerzsenyi, T. B., et al. Investigation and optimization of DNA isolation efficiency using ferrite-based magnetic nanoparticles. *Biotechnol. Rep.*, 2025, 47, e00904.
93. Ilosvai, Á. M., et al. Simplified Synthesis of the Amine-Functionalized Magnesium Ferrite Magnetic Nanoparticles and Their Application in DNA Purification Method. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24, 14190. DOI: 10.3390/ijms241814190.

94. Lu, A.-H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46(8), 1222–1244.
95. Butterworth, M. D.; Illum, L.; Davis, S. S. Preparation of ultrafine silica- and PEG-coated magnetite particles. *Colloids Surf. A*, 2001, 179(1), 93–102.
96. Mushtaq, M., et al. Polymer-coated CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoassemblies as biocompatible magnetic nanocarriers for anticancer drug delivery. *J. Mater. Sci.*, 2017, 52.
97. Häfeli, U. The History of Magnetism in Medicine. In *Magnetism in Medicine*; 2006; pp 1–25.
98. Stueber, D. D., et al. Magnetic Nanoparticles in Biology and Medicine: Past, Present, and Future Trends. *Pharmaceutics*, 2021, 13(7), 943.
99. Su, Y.-H., et al. Removal of high-molecular-weight DNA by carboxylated magnetic beads... *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008, 1137, 82–91.
100. Laurent, S., et al. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization. *Chem. Rev.*, 2008, 108(6), 2064–2110.
101. Wang, H., et al. Crop DNA extraction with lab-made magnetic nanoparticles. *PLoS One*, 2024, 19(1), e0296847.
102. Lodha, A., et al. Isolation of PCR ready-human DNA using copper nanoparticles from skeletal remains. *Forensic Sci. Int.*, 2017, 270, 146–152.
103. Kuo, C.-W., et al. Rapid glycopeptide enrichment and N-glycosylation site mapping... *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, 402(9), 2765–2776.
104. Asparia Glycomics. PNGase F Carboclip (product page). Online resource: [aspariaglycomics.com](http://aspariaglycomics.com) (accessed: February, 2022).
105. GL Sciences. MonoSpin NH<sub>2</sub> (product page). Online resource: [glsciencesinc.com](http://glsciencesinc.com) (accessed: March, 2022).
106. Waters. User manual 720004882en (PDF). Online resource: [waters.com](http://waters.com) (accessed: November, 2025).
107. English, P. A., et al. A case for the use of receiver operating characteristic analysis... *Future Oncol.*, 2016, 12(2), 175–182.
108. Akoglu, H. User's guide to correlation coefficients. *Turk. J. Emerg. Med.*, 2018, 18(3), 91–93.
109. Autobio Diagnostics. Company website. Online resource: [autobio.com.cn](http://autobio.com.cn) (accessed: May, 2022).
110. Pongracz, T., et al. Blood N-glycomic signature of fibrosis in MASLD... *medRxiv*, 2024, 2024.09.19.24313949.

111. Dojcsák, D., et al. NH<sub>2</sub>-Functionalized Magnetic Nanoparticles for the N-Glycomic Analysis of Patients with Multiple Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23(16), 9095.
112. SCIEX. Hungary store page. Online resource: [sciex.com](https://www.sciex.com/hungary) / Fast glycan labeling and analysis kits
113. SAS Blogs. Interpret Spearman/Kendall correlation (blog post). Online resource: [blogs.sas.com](https://blogs.sas.com) (accessed: April 5, 2023).
114. Turčić, A., et al. Higher MRI lesion load in multiple sclerosis is related to the N-glycosylation changes of cerebrospinal fluid immunoglobulin G. *Mult. Scler. Relat. Disord.*, 2023, 79.
115. Axford, J. S. Glycosylation and rheumatic disease. *BBA – Mol. Basis Dis.*, 1999, 1455(2), 219–229.

## Mellékletek

### 1. Rövidítések jegyzéke

A: appendicitis mintacsoport jelölése (appendicitis)

ACE2: angiotenzin-konvertáló enzim 2 receptor (angiotensin-converting enzyme 2 receptor)

ACN: acetonitril (acetonitrile)

AIH: autoimmun hepatitis (autoimmune hepatitis)

ANC: abszolút neutrophil sejtszám (absolute neutrophile cell count)

Asn: aszparagin, semleges, poláris oldalláncú aminosav (asparagine)

AUC: görbe alatti terület (area under the curve)

BEH Amid: szilícium-szerves hibrid szerkezettel és amid funkciós csoporttal ellátott kromatográfiás oszlop (BEH Amide)

RA%: glikánok relatív abundanciája, azaz a fluoreszcens kromatogram csúcs alatti terület százalékos eloszlása (relative abundance)

CE: kapilláris elektroforézis (capillary electrophoresis)

CE-LIF: kapilláris elektroforézis lézer-indukált fluoreszcens detektálással (capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection)

cIEF: kapilláris izoelektromos fókuszálás

COVID-19: koronavírus betegség (Coronavirus Disease 2019)

CRP: C-reaktív fehérje (C-reactive protein)

CSF: cerebrospinális folyadék (cerebrospinal fluid)

CV: relatív szórás, variációs koefficiens (coefficient of variation)

DMSO: dimetil-szulfoxid; poláris aprotikus oldószer (dimethyl sulfoxide)

DNS: dezoxiribonukleinsav (deoxyribonucleic acid)

DMB: 2-((3',5'-dimetil-4'-hidroxifenil)-azo)-benzoesav (1,2-diamino-4,5- methylenedioxybenzene)

E1/E2: első elúciós fázis / második elúciós fázis

ECD: elektronbefogási disszociáció (electron capture dissociation)

ELISA : enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat, immunológiai technika antigének vagy antitestek kimutatására (enzyme-linked immunosorbent assay)

FDA: Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (Food and Drug Administration)

FLD: fluoreszcens detektor (fluorescence detector)

Fuc: fukóz (fucose)



FUT7:  $\alpha$ -(1,3)- fukoziltranszferáz ( $\alpha$ -(1,3)-fucosyltransferase 7)

FUT8:  $\alpha$ -(1,6)- fukoziltranszferáz ( $\alpha$ -(1,6)-fucosyltransferase)

Gal: galaktóz (galactose)

GC-MS: gáz kromatográfia tömegspektrometriai detektálással (gas chromatography-mass spectrometry)

GlcNAc: N-acetil-glükózamin (N-acetylglucosamine)

HILIC : hidrofil kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfiás módszer (hydrophilic interaction liquid chromatography)

HK: hasi fájdalommal rendelkező kontroll csoport az appendicitis kohortban (abdominal pain diagnosed subgroup)

HPAEC-PAD: nagy felbontású anioncserélő kromatográfia pulzáló amperometriás detektálással (high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection)

IBD: krónikus gyulladásos bélbetegség (inflammatory bowel disease)

IgG: immunoglobulin G-típusú antitest (immunoglobulin G)

IL-6: interleukin-6 (interleukin-6)

LC: folyadékkromatográfia (liquid chromatography)

LDA: lineáris diszkrimináns analízis (linear discriminant analysis)

MALDI-MS: mátrix asszisztált lézer deszorpciós ionizációs tömegspektrométer

Man: mannóz (mannose)

MECC: micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfia

Milli-Q víz: ultratisztaságú, laboratóriumi célra előállított víz; ellenőrzött vezetőképesség kisebb, mint 18,2 M $\Omega$ ·cm (ultrapure water)

MNP: mágneses nanorészecske (magnetic nanoparticle)

MS: tömegspektrometria (mass spectrometry)

MS/MS: tandem vagy fragmentációs tömegspektrometria (tandem mass-spectrometry)

Neu5Ac: N-acetil-neuraminsav (N-acetylneuraminic acid.)

NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (G): glikolban diszpergált nikkelferit alapú amin-funkcionalizált mágneses nanorészecske (szárítás nélkül)

NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (Sz): szárítással előállított nikkelferit alapú amin-funkcionalizált mágneses nanorészecske

NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (V): vízben diszpergált nikkelferit alapú amin-funkcionalizált mágneses nanorészecske (szárítás nélkül)

NK: normál laborparaméterekkel rendelkező kontroll alcsoport az appendicitis kohortban (normal control subgroup)

NMR: mágneses magrezonancia

O/N: egész éjszakán át tartó inkubáció (overnight)

OD450: optikai denzitás (elnyelés) 450 nm hullámhosszon (optical density at 450 nm)

PEG: polietilén glikol (polyethylene glycol)

pH: az oldat hidrogén-ion koncentrációja (potential of hydrogen)

PLNO : részhurkos injektálás túl töltéssel; félautomata mintaadagolási mód (partial loop with needle overfill)

PNGase F: peptid N-glikozidáz, azaz a peptidekről specifikusan N-glikánokat lehasító enzim (peptide N-glycosidase F)

ProA: prokainamid (procainamide)

RA: reumatoid arthritis (rheumatoid arthritis)

ROC: karakterisztikus görbeanalízis (receiver operating characteristic)

rpm: percenkénti fordulatszám (revolutions per minute)

RT: retenció idő (retention time)

RP-HPLC: reverz-fázisú folyadékkromatográfia

Ser: szerin, poláris, hidroxilcsoportot tartalmazó aminosav (serine)

SM: sclerosis multiplex betegség (multiple sclerosis)

SNFG: egységesített szimbólum alapú glikán nomenklatura (Symbol Nomenclature for Glycans)

SZFF: szabad festék fluoreszcens intenzitás (free dye fluorescence intensity)

Thr: treonin, poláris, hidroxilcsoportot tartalmazó aminosav (threonine)

ToF: repülési idő alapú tömegspektrometria (time-of-flight mass spectrometry)

UHPLC-SQD MS: ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfia kvadrupól detektoros tömegspektrometriával kapcsolatban (ultra-high-performance liquid chromatography–single quadrupole detector mass spectrometry)

UHPLC-Xevo G2-XS QToF MS: ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfia Xevo G2-XS kvadrupól-időrepüléses tömegspektrométerrel kapcsolatban (ultra-high-performance liquid chromatography coupled with Xevo G2-XS quadrupole time-of-flight mass spectrometry)

WAX: gyenge anioncserélő kromatográfia (weak anion-exchange chromatography)

WBC: fehérvérsejtszám (white blood cell)

WHO: Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

30×, 20×, 15×, 10× MNP hígítások: hígítási fokra utalnak, azaz hogy az MNP diszperzió milyen mértékben hígított a kiindulási diszperzióhoz képest

$[m/z]^{2+/3+}$ : tömeg/töltés arány kétszeresen és háromszorosan töltött ionokra (mass-to-charge ratio)

## 2. Ábra-és táblázatjegyzék

### Ábrajegyzék

- 1. ábra:** A humán N-glikánokra jellemző monoszacharid-összetétel (A) és glikán típusok, a magas mannóztartalmú, hibrid és komplex szerkezetek példáival (B), valamint a komplex glikánok jellemző módosulásainak (pl. fukoziláció, biszekció, antennaritás, galaktoziláció, szializáció, szialsav,-és mannóz-kar specifikus kötések) szemléltetése (C). ..... - 5 -
- 2. ábra:** A glikán molekulák karakterizálásának lehetséges útvonalai és módszerei Karin Marino áttekintése alapján [7]. Rövidítések a „Mellékletek - Rövidítések jegyzékében” lettek feltüntetve. .... - 14 -
- 3. ábra:** Mágneses nanorészecskével történő glikán tisztítás folyamatábrája. 1. Kondicionálás: MNP-oldat kimérése, 2. Adszorpció: szérumból felszabadított N-glikán minta MNP felületén történő megkötődése, 3. Mosás: 95 (v/v)%-os ACN oldattal történő aspecifikus molekulák eltávolítása, 4. Elúció: adott elúciós pufferben glikánok deszorpciója az MNP felületéről. .... - 24 -
- 4. ábra:** NH<sub>2</sub>-vagy CH<sub>3</sub>CONH<sub>2</sub>-funkcionalizált MonoSpin oszlopos készlettel történő tisztítás lépései: a kereskedő oldalán megtalálható folyamatábra kiegészítésével. 1. Kondicionálás: MonoSpin oszlop aktiválása a tisztítás során alkalmazott mosó és elúciós pufferekkel, 2. Adszorpció: glikán minta adszorpciója az funkciós-csoporttal ellátott oszlop felületén NH<sub>2</sub>-vagy CH<sub>3</sub>CONH<sub>2</sub>-funkciós csoportokon keresztül, 3. Mosás: 85 (v/v)%-os ACN oldattal történő aspecifikus molekulák eltávolítása, 4. Elúció: glikánok deszorpciója az oszlopról 1 (v/v)%-os hangyasav -és 150 mM ammónium-formiát pufferek alkalmazásával..... - 26 -
- 5. ábra:** Hamilton Microlab Prep pipettázó robotikus platform egységeinek ismertetése. ... - 27 -
- 6. ábra:** Teljes szérumból származó N-glikánprofil fluoreszcens detektálással (A) és tömegspektrometriás analízissel rögzített eloszlást, valamint a pontos struktúra azonosítást alátámaszt MS/MS (fragmentációs) spektrumot (B) mutatja be. .... - 29 -
- 7. ábra:** GlycoWorkbench szoftver grafikus felülete (ingyenesen elérhető: <https://glycoworkbench.software.informer.com/2.1/> felületről)..... - 34 -
- 8. ábra:** A NH<sub>2</sub>-funkcionalizált mágneses nanorészecskék (MNP) négy különböző típusának glikánok tisztítására való alkalmasságának értékelése az összesített glikán csúcs- és SZFF intenzitás értékei alapján. (A) Összesített glikán intenzitás [EU] MNP típusok szerint, medián alapján; (B) SZFF intenzitás [EU] MNP típusok szerint. A glikoformák és SZFF

párhuzamos mintákra vonatkozó CV-értékek a diagramok alatti táblázatban kerültek jelölésre..... - 39 -

**9. ábra:** Egészséges humán szérumból származó glikán tisztítás különböző koncentrációjú  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (Sz) típusú MNP alkalmazásával (16, 8, 4, 2, 1 és 0,5 mg/ml) a tíz legabundánsabb glikoformára vonatkozóan (GF: glikoformák). (A) a 10 legabundánsabb glikoformához tartozó fluoreszcens intenzitás [EU]; (B) a 10 legabundánsabb glikoforma RA% értékei. Az X tengelyen az alkalmazott MNP-koncentrációk szerepelnek. Az osztott oszlopdiagram színei az egyes glikoformákat reprezentálják, amelyekhez tartozó színekódok – zárójelben az átlagos RA% értékkel – a diagram melletti jelmagyarázatban találhatók. .... - 40 -

**10. ábra:** Egészséges humán szérum mintából származó glikán tisztítás különböző koncentrációjú  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  MNP-k alkalmazásával glikolos (G; 30×, 20×, 15×, 10×) és vizes (V; 16, 8, 4, 2, 1 és 0,5 mg/ml) protokollokban. (A, C) a 10 legabundánsabb glikoformához tartozó fluoreszcens intenzitás [EU]; (B, D) a 10 legabundánsabb glikoforma RA% értékei. A kontrollt (K) a 4 mg/ml  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (Sz) MNP-vel történő tisztítás jelentette. Az osztott oszlopdiagram színei az egyes glikoformákat reprezentálják, amelyekhez tartozó színekódok – zárójelben az átlagos RA% értékkel – a diagram melletti jelmagyarázatban találhatók. A glikolos és vizes közeg eredményei az első négy legabundánsabb glikoformát (azonos színnel jelölve) leszámítva eltérő glikánprofilokat tartalmaztak. .... - 42 -

**11. ábra:** Elúciós pufferek hatékonyságának vizsgálata: MNP-alapú, valamint kereskedelmi forgalomban kapható  $\text{NH}_2$ -vagy  $\text{CH}_3\text{CONH}_2$ -funkcionalizált oszlopok glikán tisztítási teljesítményének összehasonlítása a tíz legabundánsabb glikoformára jellemző glikán csúcs intenzitások, RA% és SZFF intenzitás alapján. (A) a 10 legabundánsabb glikoformához tartozó fluoreszcens intenzitás [EU]; (B) a 10 legabundánsabb glikoforma RA% értékei; (C) SZFF intenzitás [EU] logaritmikus skálán. E1: ultratiszta Milli-Q víz, E2: 150 mM ammónium-formiát oldat (pH 4,4), MNP (V): 0,5 mg/ml  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (V) MNP, (O): centrifugális oszlopos készlet. .... - 44 -

**12. ábra:** Automatizált MNP-protokoll összehasonlítása manuálisan elvégzett tisztítással. (A) a 10 legabundánsabb glikoformához tartozó fluoreszcens intenzitás [EU]; (B) a 10 legabundánsabb glikoforma RA% értékei. ns: statisztikailag nem szignifikáns. .... - 46 -

**13. ábra:** Kísérleti munkafolyamat a humán szérum N-glikozilációs mintázatok elemzésére ..... - 47 -

- 14. ábra:** Szignifikáns eltéréseket mutató N-glikán szerkezetek a nem szerint csoportosított Kontroll és SM mintacsoportok között. A: FA2#1 (RT: 16,07 perc;  $[842,11]^2$ ;  $p=0,04$ ), B: FA2G2S1#16 (RT: 25,89 perc;  $[1149,74]^{2+}$ ;  $p=0,05$ ), C: A2G2S1#13 (RT: 24,57 perc;  $[1076,77]^{2+}$ ;  $p=0,01$ ), D: FA2BG2S1#19 (RT: 26,90 perc;  $[1251,62]^{2+}$ ;  $p=0,01$ ). \*:  $p\leq 0,05$ ; \*\*:  $p\leq 0,01$ . ..... - 49 -
- 15. ábra:** Lineáris diszkrimináns analízis az SM és Kontroll mintacsoportok elválásának vizsgálatára. Piros színnel jelölve a Kruskal-Wallis tesztben szignifikánsan változott glikán struktúrákat. Fekete félkövér stílussal kiemelt glikoformok az LDA analízisben az első két tengely mentén kiemelkedő hozzájárulást mutattak: A2G2S2#18 (RT: 26,78 perc;  $[1222,06]^{2+}$ ), A2G2S2#21 (RT: 28,23 perc;  $[1222,06]^{2+}$ ), FA2G2S2#24 (RT: 29,24 perc;  $[1295,09]^{2+}$ ), A3G3S3#32 (RT: 32,91 perc;  $[1550,17]^{2+}$ ), FA3G3S3#36 (RT: 34,21 perc;  $[1623,20]^{2+}$ ). ..... - 50 -
- 16. ábra:** Szializált és neutrális glikánstruktúrák RA% értékeinek változása a COVID-19 kohortban. A: A2G2S2#21 (RT: 26,30 perc;  $[1222,06]^{2+}$ ), B: FA2G2S2#23 (RT: 27,33 perc;  $[1295,09]^{2+}$ ;  $p=0,02$ ;  $p<0,001$ ), C: A2G2S1#13 (RT: 22,47 perc;  $[1076,52]^{2+}$ ), D: FA2#1 (RT: 13,30 perc;  $[841,94]^{2+}$ ), E: A3G3S3#38 (RT: 34,12;  $[1550,18]^{2+}$ ;  $p=0,046$ ;  $p=0,01$ ), F: M5#2 (RT: 14,67 perc;  $[727,89]^{2+}$ ). \*\*:  $p\leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p\leq 0,001$ . ..... - 52 -
- 17. ábra:** A glikán struktúrák területszázalék-alapú diszkriminációja COVID-19 fertőzésen átesett (Covid+) és COVID-19 fertőzésen nem átesett (Covid-) csoportok között az oltottság függvényébe. Piros színnel jelölve a 16. ábrán bemutatott struktúrák, \* szimbólummal jelölve a szignifikánsan változó struktúrák: A2G2S2#21 (RT: 26,30 perc;  $[1222,06]^{2+}$ ), A2G2S1#13 (RT: 22,47 perc;  $[1076,52]^{2+}$ ), FA2G2S2#23 (RT: 27,33 perc;  $[1295,09]^{2+}$ ), FA2#1 (RT: 13,30 perc;  $[841,94]^{2+}$ ), A3G3S3#38 (RT: 34,12;  $[1550,18]^{2+}$ ), M5#2 (RT: 14,67 perc;  $[727,89]^{2+}$ ). ..... - 53 -
- 18. ábra:** A2G2S2#21 és FA2G2S2#23 glikánstruktúrák ROC analízise a fertőzésen való átesettség hatásának elkülönítésére oltott mintacsoportokon belül. A: A2G2S2#21 (RT: 26,30 perc;  $[1222,06]^{2+}$ ) struktúra ROC görbéje, amely a Covid+Oltás+ csoportot jellemzi, B: FA2G2S2#23 (RT: 27,33 perc;  $[1295,09]^{2+}$ ) struktúra ROC görbéje, amely az Covid-Oltás+ csoportot jellemzi. A ROC görbék alatti táblázat magába foglalja az AUC értékeket, a hozzájuk tartozó standard hibát, valamint a szignifikancia szinteket és 95%-os konfidenciaintervallumokhoz tartozó alsó-és felső határ értékeit. .... - 54 -
- 19. ábra:** A Spearman- és Point-Biserial korrelációs elemzés hő térképe, amely az egyes glikán csúcsok vakbélgyulladás-betegségpontszámra gyakorolt hatását szemlélteti. A 7-nél

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| magasabb értékeket erős korrelációnak tekintettük. (A paraméterpárok közötti korrelációs együtthatók (R) értelmezése: $10^{-1}$ skálán, $p < 0,001$ ) [113].                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | - 56 - |
| <b>20. ábra:</b> RA% értéktől függően szignifikánsan eltérő glikánstruktúrák mintacsoportok (Kontroll és Appendicitis) közötti szeparációjának vizualizálása pair plot diagramon. A diagramon csak a Mann-Whitney teszt alapján szignifikáns és 0,5 értéktől magasabb RA%-kal rendelkező glikánok kerültek feltüntetésre.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | - 58 - |
| <b>21. ábra:</b> ROC görbe analízis a kontroll és az appendicitis mintacsoportok között a szignifikánsan változott glikán struktúrákra nézve. Nullhipotézis: AUC=0,5. Megbízhatósági intervallum: 99%. A ROC görbe alatti táblázat összefoglalja az analízis AUC, std. deviáció, aszimptotikus szignifikancia, valamint a konfidencia intervallum alsó- és felső határának értékeit. A: A2G2S1#19 (RT: 22,44 perc; $[1076,51]^{2+}$ ), A2BG3S2#31 (RT: 27,75 perc; $[1404,63]^{2+}$ ), M7#17 (RT: 21,83 perc; $[889,94]^{2+}$ ) (FA2G2S2#24 (RT: 24,76 perc; $[1295,09]^{2+}$ ), B: A3G3S3#34 (RT: 28,05 perc; $[1550,18]^{2+}$ ), A2G2S2#25 (RT: 25,12 perc; $[1222,06]^{2+}$ ). | - 59 - |
| <b>22. ábra:</b> N-glikán biomarkerek diagnosztikai potenciálja gyermekkori vakbélgyulladásban.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | - 60 - |

### Táblázatjegyzék

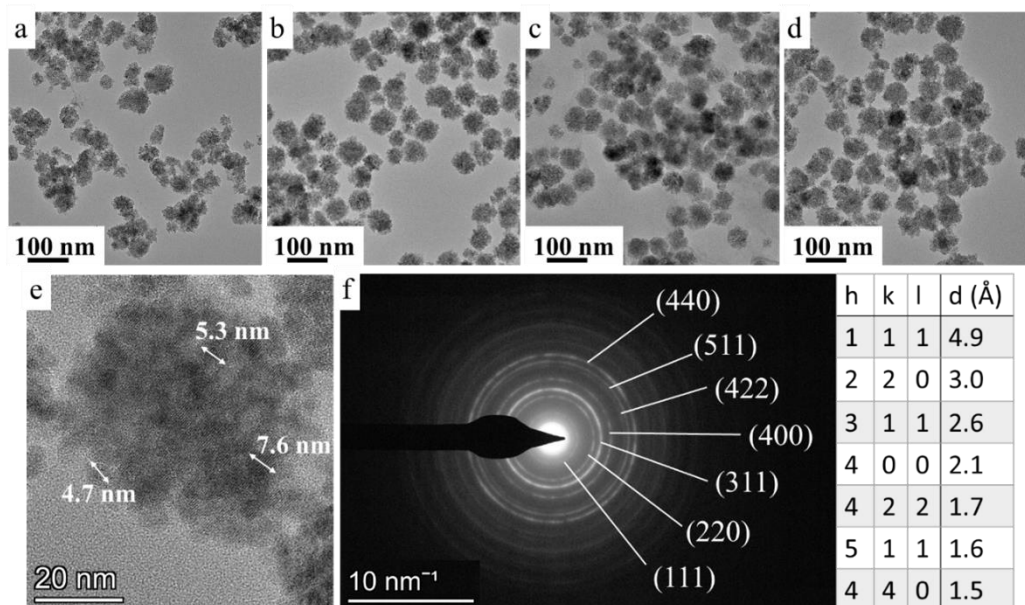
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>1. táblázat:</b> Az egészséges állapotra jellemző N-glikozilációs mintázatok, valamint a különböző gyulladásos és fertőzőes betegségekben megfigyelt és szakirodalomban leírt módosulások ismertetése.                                                                                                                                                   | - 12 - |
| <b>2. táblázat:</b> Waters Acquity UHPLC és MS eszközök beállított paraméterei a mérések során                                                                                                                                                                                                                                                              | - 31 - |
| <b>3. táblázat:</b> Az optimalizált $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (V) MNP protokoll és kereskedelmi forgalomban kapható készletek ( $\text{NH}_2$ - és $\text{CH}_3\text{CONH}_2$ -funkcionalizált MonoSpin oszlopos, mágneses gyöngy alapú glikán mintaelőkészítési készlet) költségeinek összehasonlítása a gyártótól kapott árajánlatok alapján. | - 45 - |
| <b>4. táblázat:</b> ELISA teszt eredményének összefoglalása: a spektrofotometriás abszorbancia és a tesztben alkalmazott küszöbérték alapján meghatározott pozitivitás eredményeket tartalmazva. Abszorbancia küszöbérték: $[A_{450}]_{\text{pozitív kontroll}} \times 0,15 = 0,1$ ; negatív: $[A_{450}] < 0,1$ ; pozitív: $[A_{450}] \geq 0,1$ .           | - 51 - |
| <b>5. táblázat:</b> A glikánstruktúrák és betegség közötti korreláció Point-Biserial tesztel és a glikán struktúrák közötti korreláció Spearman-tesztel (zárójelben feltüntetve a korrelációs                                                                                                                                                               |        |

együttható értékek (R), a hőtérképről). A táblázat alsó részében az adott klinikai paraméter és glikán struktúrák közötti Spearman-teszttel elvégzett korrelációs eredménye. .... - 57 -

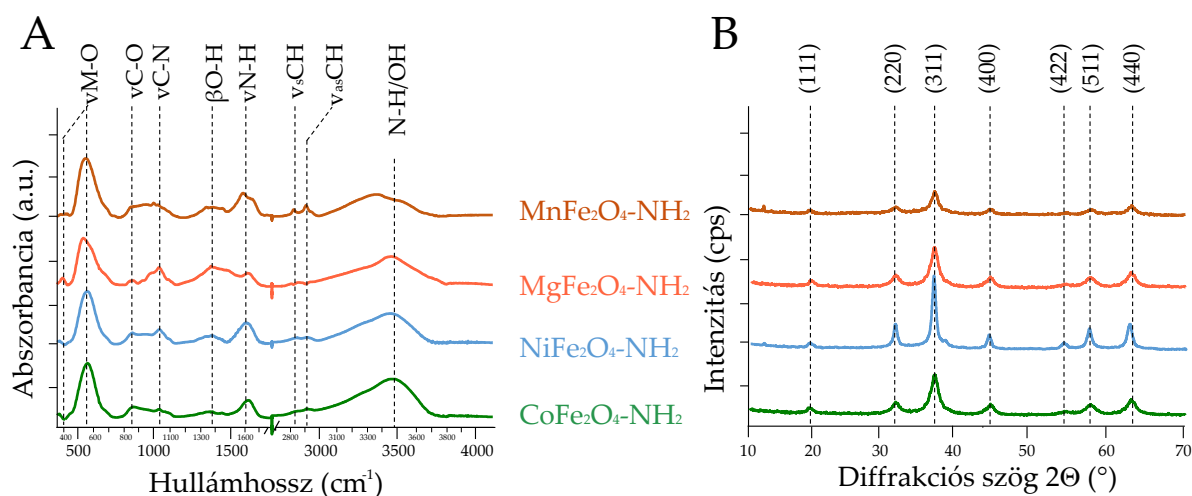
### 3. 1. számú mellékletek

A mágneses nanorészecskék karakterizációját Dr. Vanyorek László munkacsoportjával végeztük el. A vizsgált nanorészecskék méretét és morfológiáját transzmissziós elektron mikroszkóp (TEM) felvételek mutatják, ami alapján szférikus morfológiát tulajdoníthatunk a részecskéknak (1. számú melléklet 1. ábra (a-d)). Nagy-Felbontású TEM (HRTEM) felvételen jól láthatók a rácssíkok, a 4,7 nm, 5,3 nm, 7,6 nm jelölésekkel. Röntgendiffrakciós (XRD) mérésekkel megállapítottuk a rácssík-távolságot (d-spacing) értéket ångström (Å) mértékegységben kifejezve (1. számú melléklet 1. ábra f táblázatának d oszlopa). A mért rácssík-távolság értékek 1,5–4,9 Å között mozognak, és jól megfeleltethetők a (111), (220), (311) és (400) értékekkel jelölt kristálysíkoknak, amelyek a mágneses oxidokra, mint például magnetitre jellemzőek. A XRD minta gyűrűi megerősítik a kristályos szerkezetet, és azonosíthatók a diffrakciós síkokhoz tartozó távolságok alapján. A mágneses részecskék felszíni funkciós csoportjainak azonosítása FTIR spektroszkópiával történt, aminek eredményét és részletes leírását az 1. számú melléklet 2. ábrája szemlélteti. Az FTIR spektrumokon a ferritek esetében szén-tartalmú funkciós csoportok voltak azonosíthatók, amelyek az adszorbeált etanolaminból és etilénglikolból származnak. Ezért CHNS elemzést végeztünk a szén- és nitrogéntartalom pontos meghatározására (1. számú melléklet 1. táblázat). A mágneses részecskék széntartalma 1,7-és 6,4 (m/m)% között változott. A legalacsonyabb széntartalmat a mangán-ferrit mintában (1,7 (m/m)%), míg a legmagasabb a magnézium-és nikkelferritek esetében volt tapasztalható (6,4-és 6,3 (m/m)%). A nitrogéntartalom a nikkelferrit mintában volt legmagasabban, pontosan 1,4 (m/m)% volt kimutatható, ami amin-funkciós csoportok jelenlétére utal. Ezek egyben alátámasztják azokat az eredményeket, miszerint a  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  MNP volt a leghatékonyabb a glikán tisztítás alkalmazására, ami a ferritek amin-csoportja és a glikánok hidroxil-csoportja között létrejövő kötés révén tud megvalósulni. Ennek alátámasztására a továbbiakban bemutatott eredmények szolgálnak.





**1. ábra\_1. sz. melléklet:** TEM felvétel a  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (a),  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (b),  $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (c)  $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$  (d) nanorészcsekről és a  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  nanorészcsekének az elektron röntgendiffrakciós mintázata (XRD) (e), illetve a mért rácssík-távolság (d-spacing) értéke ångström ben (Å) megadva (f).



**2. ábra\_1. sz. melléklet:**  $\text{NH}_2$ -funkcionalizált ferrit alapú mágneses nanorészcsek FTIR (A) és XRD (B) analízisének eredménye.

A, ábra részletes magyarázata: A fém-oxid ( $\nu\text{M-O}$ ) spinális szerkezetében kötődő rezgések által 2 sávot azonosítottunk: a tetrahedrális komplexhez való kötődést  $500\text{ cm}^{-1}$  -  $600\text{ cm}^{-1}$  hullámhosszon, míg az oktahedrális komplexhez való kötődést  $400\text{ cm}^{-1}$  -  $450\text{ cm}^{-1}$  hullámhosszon értékeltük. A sávok az alábbi hullámhosszokon rendelhetők a  $\text{Fe}^{3+}\text{-O}^{2-}$  A-rács szerkezet rezgéseire:  $581\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ ),  $586\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ ),  $567\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ ) és  $595\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ ). A spektrumokon  $800\text{ cm}^{-1}$  és  $900\text{ cm}^{-1}$  között

megjelenő sáv az etilén glikolról származó alkohol csoport  $\nu\text{C-O}$  kötési rezgését jelenti. A ferritek felületén adszorbeálódó etanolamin molekulákból származó  $\text{NH}_2$  funkciós csoportok ( $\nu\text{C-N}$ )  $1050\text{ cm}^{-1}$  és  $1630\text{ cm}^{-1}$  hullámhossz között jelennek meg. Az alacsony intenzitású sávok  $1370\text{ cm}^{-1}$  és  $1410\text{ cm}^{-1}$  hullámhosszon hidroxil csoportokat jelezhet ( $\beta\text{OH}$ ). Az alifás és aromás  $\text{C-H}$  kötésekéből származó szimmetrikus és asszimmetrikus kötési rezgések két apró rezgésként jelentkeznek  $2850\text{ cm}^{-1}$  and  $2930\text{ cm}^{-1}$  hullámhossz körül. Ezek a sávok a részecskék felületén lévő etilén-glikol és etanol-amin származékok következményei lehetnek.  $3000\text{ cm}^{-1}$  -  $3750\text{ cm}^{-1}$  közötti adszorpciós sávok hidroxil és amin csoportoknak a kötési rezgéseit jelentik. B, ábra részletes magyarázata: a 4 amin funkcionális ferrit nanorészecske XRD analízise során 7 reflexiós csúcsot azonosítottunk:  $18,4^\circ$  (111),  $30,1^\circ$  (220),  $35,4^\circ$  (311),  $43,1^\circ$  (400),  $53,3^\circ$  (422),  $56,8^\circ$  (511) és  $62,5^\circ$  (440) két Theta-fok, amelyek alátámasztják a  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{MgFe}_2\text{O}_4$  és  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  spinellszerkezetének jelenlétét (PDF 22-1086; PDF: 54-0964; PDF 36-0398 és PDF 74-2403).

**1. táblázat\_1. sz. melléklet:** A ferrit nanorészecskék széntartalma (wt%), nitrogéntartalma (wz%), fajlagos felülete ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) és átlagos részecskemérete (nm) röntgendiffrakciós (X-ray Diffraction) elemzés alapján.

|                                                                     | $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ | $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ | $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ | $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>C tartalom (wt %)</b>                                            | 6,3                                   | 1,7                                   | 6,4                                   | 2,5                                   |
| <b>N tartalom (wt %)</b>                                            | 1,4                                   | 0,3                                   | 0,6                                   | 0,4                                   |
| <b>Fajlagos részecskefelület (<math>\text{m}^2/\text{g}</math>)</b> | 93,8                                  | 155                                   | 86,3                                  | 279,4                                 |
| <b>Részecske átmérő (nm)</b>                                        | $6 \pm 2$                             | $8 \pm 1$                             | $6 \pm 1$                             | $4 \pm 2$                             |

**2. táblázat\_1. sz. melléklet:** N-glikán mintaelőkészítésben alkalmazott pufferek, oldatok elkészítése, feltüntetve az adott puffer alkalmazási területével

| <b>Puffer neve</b>             | <b>Elkészítés, recept</b>                                                                                                                                                       | <b>Alkalmazási terület</b>                                 |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 95 (v/v)% ACN                  | 95/15 (v/v)%-os ACN/50 mM ammónium-formiát (pH 4,4) puffer elkészítése 1 l végtérfogatra.                                                                                       | MNP-protokoll és MonoSpin oszlopos protokoll mosó puffer   |
| 150 mM ammónium-formiát puffer | 9,46 g ammónium-formiát 800 ml Milli-Q vízben oldva, majd a pH-t 4,4 értékre állítása LC-MS minőségű 25 (v/v)%-os ammónia oldattal (kb. 4 ml) és végtérfogatot 1 l-re állítása. | MonoSpin oszlopos készlet és MNP-protokoll elúciós puffere |

|                                        |                                                                                                                                                                                            |                                           |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 1 (v/v)% hangyasav puffer              | 400 ml Milli-Q vízbe 5 ml formiát sav mérése, kevertetés, majd a végtérfogatot kiegészítése 500 ml-re.                                                                                     | MonoSpin oszlopos készlet elúciós puffer1 |
| 50 mM ammónium-formiát (pH 4,4) puffer | 1,886 ml LC-MS minőségű hangyasav 800 ml Milli-Q vízben oldva, majd LC-MS minőségű 25 (v/v)%-os ammónia oldattal (kb. 4 ml) az oldat pH 4,4 értékre állítása. Végtérfogatlal kiegészítése. | HILIC-UHPLC elválasztás puffere           |

## 4. 2. számú mellékletek

**1. táblázat\_2. sz. melléklet:** Sclerosis multiplex és kontroll mintacsoportok TSNG analízis statisztikai eredményei. Glikánstruktúra neve#x [Elméleti  $m/z$ ]<sup>2+</sup> (#x: glikán csúcs sorszáma a fluoreszcens kromatogramon), retenciós idő [perc], átlag RA% -és standard deviáció mintacsoportonként, Shapiro-Wilk normalitás teszt beteg és kontroll csoportra osztva nézve (konfidencia-intervallum: 95%), Kruskal-Wallis szignifikáns különbségek keresésére: kontroll és sclerosis multiplex mintacsoportok összehasonlítása nemek szerinti csoportosításban (konfidencia-intervallum: 95%,  $p=0,05$ ).

| Glikánstruktúra neve#x<br>[Elméleti $m/z$ ] <sup>2+</sup> | Retenciós idő [min] #x | Átlag RA% (C_F) | Std. dev. | Átlag RA% (C_N) | Std. dev. | Átlag RA% (SM_F) | Std. dev. | Átlag RA% (SM_N) | Std. dev. | Shapiro-Wilk Normalitás teszt | Kruskal-Wallis teszt (* $p \leq 0,05$ ; ** $p \leq 0,01$ ) |
|-----------------------------------------------------------|------------------------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|------------------|-----------|------------------|-----------|-------------------------------|------------------------------------------------------------|
| FA2#1<br>[841,94] <sup>2+</sup>                           | 16,07 #1               | 3,88            | 1,26      | 3,41            | 1,13      | 3,67             | 1,40      | 2,83             | 0,98      | 0,043                         | *0,04                                                      |
| M5#2<br>[727,89] <sup>2+</sup>                            | 17,29 #2               | 0,97            | 0,20      | 1,00            | 0,26      | 0,87             | 0,16      | 1,15             | 0,33      | 0,000                         | *0,04                                                      |
| FA2B#3<br>[943,48] <sup>2+</sup>                          | 17,55 #3               | 0,89            | 0,30      | 0,88            | 0,30      | 0,86             | 0,22      | 0,82             | 0,27      | 0,003                         | 0,82                                                       |
| FA2(6)G1#4<br>[922,97] <sup>2+</sup>                      | 19,04 #4               | 3,65            | 1,15      | 3,60            | 0,77      | 3,45             | 1,10      | 3,11             | 0,77      | 0,065                         | 0,24                                                       |
| FA2(3)G1#5<br>[922,97] <sup>2+</sup>                      | 19,47 #5               | 1,74            | 0,47      | 1,61            | 0,41      | 1,49             | 0,61      | 1,42             | 0,41      | 0,129                         | 0,27                                                       |
| FA2(6)BG1#6<br>[1024,51] <sup>2+</sup>                    | 20,14 #6               | 0,92            | 0,19      | 1,03            | 0,20      | 0,97             | 0,26      | 1,05             | 0,24      | 0,560                         | 0,42                                                       |
| FA2(3)BG1#7<br>[1024,51] <sup>2+</sup>                    | 20,56 #7               | 0,34            | 0,12      | 0,30            | 0,13      | 0,27             | 0,06      | 0,31             | 0,10      | 0,322                         | 0,33                                                       |
| M6#8<br>[808,91] <sup>2+</sup>                            | 20,64 #8               | 0,93            | 0,20      | 0,98            | 0,30      | 0,89             | 0,24      | 1,22             | 0,39      | 0,001                         | *0,02                                                      |
| A2G2#9<br>[930,97] <sup>2+</sup>                          | 20,94 #9               | 0,91            | 0,14      | 0,96            | 0,14      | 1,02             | 0,08      | 1,12             | 0,13      | 0,303                         | **0,01                                                     |
| FA2G2#10                                                  | 22,27                  | 3,21            | 1,01      | 3,52            | 1,02      | 2,96             | 0,82      | 3,13             | 0,86      | 0,127                         | 0,58                                                       |

|                                        |              |       |      |       |      |       |      |       |      |       |        |
|----------------------------------------|--------------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|--------|
| [1003,92] <sup>2+</sup>                | #10          |       |      |       |      |       |      |       |      |       |        |
| FA2BG2#11<br>[1105,53] <sup>2+</sup>   | 22,98<br>#11 | 0,71  | 0,18 | 0,76  | 0,18 | 0,76  | 0,18 | 1,10  | 0,24 | 0,029 | **0,01 |
| FA2BFG1#12<br>[1097,46] <sup>2+</sup>  | 23,43<br>#12 | 1,16  | 0,16 | 1,10  | 0,19 | 1,00  | 0,25 | 0,91  | 0,18 | 0,776 | **0,01 |
| A2G2S1#13<br>[1076,51] <sup>2+</sup>   | 24,57<br>#13 | 2,77  | 0,32 | 2,78  | 0,24 | 3,09  | 0,66 | 3,21  | 0,44 | 0,002 | **0,01 |
| A2G2S1#14<br>[1076,51] <sup>2</sup>    | 24,74<br>#14 | 8,44  | 0,80 | 8,31  | 0,57 | 8,79  | 0,85 | 8,88  | 0,85 | 0,385 | *0,06  |
| nem azonosított                        | 25,80<br>#15 | 1,36  | 0,39 | 1,36  | 0,40 | 1,25  | 0,37 | 1,37  | 0,47 | 0,112 | 1,00   |
| FA2G2S1#16<br>[1149,54] <sup>2+</sup>  | 25,89<br>#16 | 3,46  | 0,65 | 3,49  | 0,81 | 3,00  | 0,98 | 2,95  | 0,69 | 0,029 | *0,05  |
| FA2G2S2#17<br>[1295,09] <sup>2+</sup>  | 26,59<br>#17 | 0,68  | 0,13 | 0,65  | 0,21 | 0,78  | 0,15 | 0,72  | 0,16 | 0,859 | 0,13   |
| A2G2S2#18<br>[1222,06] <sup>2+</sup>   | 26,78<br>#18 | 2,61  | 0,79 | 2,66  | 0,90 | 1,82  | 0,62 | 1,72  | 0,41 | 0,000 | **0,01 |
| FA2BG2S1#19<br>[1251,01] <sup>2+</sup> | 26,90<br>#19 | 2,85  | 0,58 | 3,21  | 0,72 | 3,42  | 0,58 | 4,07  | 0,96 | 0,398 | **0,01 |
| FA2G2S2#20<br>[1295,09] <sup>2+</sup>  | 27,86<br>#20 | 0,44  | 0,05 | 0,40  | 0,06 | 0,42  | 0,04 | 0,38  | 0,07 | 0,177 | 0,06   |
| A2G2S2#21<br>[1222,06] <sup>2+</sup>   | 28,23<br>#21 | 31,11 | 2,42 | 30,98 | 2,44 | 32,43 | 3,18 | 32,17 | 2,85 | 0,019 | 0,13   |
| A2G2S2#22<br>[1222,06] <sup>2+</sup>   | 28,45<br>#22 | 0,65  | 0,25 | 0,56  | 0,08 | 0,46  | 0,05 | 0,39  | 0,10 | 0,000 | **0,01 |
| FA2G2S2#23<br>[1295,09] <sup>2+</sup>  | 28,98<br>#23 | 1,58  | 0,19 | 1,50  | 0,22 | 1,56  | 0,46 | 1,30  | 0,55 | 0,005 | *0,03  |
| FA2G2S2#24<br>[1295,09] <sup>2+</sup>  | 29,24<br>#24 | 3,80  | 0,66 | 3,25  | 0,68 | 3,71  | 0,92 | 3,44  | 0,63 | 0,162 | 0,12   |
| FA2BG2S2#25<br>[1396,55] <sup>2+</sup> | 29,70<br>#25 | 2,00  | 0,55 | 1,92  | 0,46 | 1,96  | 0,94 | 1,75  | 0,51 | 0,002 | 0,51   |
| nem azonosított                        | 30,05<br>#26 | 1,60  | 0,46 | 1,81  | 0,42 | 1,66  | 0,54 | 1,86  | 0,41 | 0,995 | 0,37   |
| A3G3S2#27<br>[1404,55] <sup>2+</sup>   | 31,18<br>#27 | 0,93  | 0,19 | 1,01  | 0,24 | 0,93  | 0,26 | 1,01  | 0,24 | 0,006 | 0,61   |
| A3G3S2#28<br>[1404,55] <sup>2+</sup>   | 31,26<br>#28 | 0,47  | 0,08 | 0,52  | 0,15 | 0,42  | 0,11 | 0,54  | 0,11 | 0,004 | *0,03  |
| FA3G3S2#29<br>[1477,65] <sup>2+</sup>  | 31,52<br>#29 | 0,66  | 0,22 | 0,57  | 0,23 | 0,86  | 0,33 | 0,76  | 0,36 | 0,012 | *0,04  |
| FA3G3S2#30<br>[1477,65] <sup>2+</sup>  | 31,82<br>#30 | 0,78  | 0,20 | 0,83  | 0,18 | 0,72  | 0,25 | 0,79  | 0,19 | 0,315 | 0,47   |
| A4G4S3#31<br>[1732,74] <sup>2+</sup>   | 32,68<br>#31 | 0,26  | 0,14 | 0,23  | 0,13 | 0,29  | 0,17 | 0,28  | 0,16 | 0,054 | 0,84   |
| A3G3S3#32<br>[1550,17] <sup>2+</sup>   | 32,91<br>#32 | 4,92  | 1,28 | 5,64  | 1,41 | 4,55  | 1,62 | 4,93  | 1,53 | 0,911 | 0,25   |
| FA4G3S2#33<br>[1579,12] <sup>2+</sup>  | 33,21<br>#33 | 0,83  | 0,15 | 0,84  | 0,11 | 0,89  | 0,17 | 0,88  | 0,13 | 0,565 | 0,67   |
| FA3G3S3#34<br>[1623,20] <sup>2+</sup>  | 33,64<br>#34 | 0,46  | 0,16 | 0,48  | 0,16 | 0,42  | 0,14 | 0,45  | 0,20 | 0,000 | 0,72   |

|                                       |              |      |      |      |      |      |      |      |      |       |        |
|---------------------------------------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|--------|
| A3G3S3#35<br>[1550,18] <sup>2+</sup>  | 34,11<br>#35 | 1,65 | 0,30 | 1,90 | 0,62 | 1,54 | 0,63 | 1,75 | 0,47 | 0,142 | 0,43   |
| FA3G3S3#36<br>[1623,20] <sup>2+</sup> | 34,21<br>#36 | 2,80 | 0,94 | 2,44 | 0,93 | 3,12 | 1,47 | 2,72 | 1,31 | 0,015 | 0,52   |
| A4G4S2#37<br>[1587,19] <sup>2+</sup>  | 34,59<br>#37 | 0,83 | 0,24 | 0,83 | 0,14 | 0,94 | 0,35 | 1,01 | 0,19 | 0,491 | **0,01 |
| A4G4S3#38<br>[1732,74] <sup>2</sup>   | 35,66<br>#38 | 0,62 | 0,12 | 0,63 | 0,11 | 0,62 | 0,11 | 0,60 | 0,15 | 0,608 | 0,73   |
| A4G4S4#39<br>[1878,21] <sup>2+</sup>  | 36,07<br>#39 | 0,58 | 0,24 | 0,60 | 0,18 | 0,63 | 0,27 | 0,56 | 0,19 | 0,058 | 0,62   |
| nem azonosított                       | 36,78<br>#40 | 0,22 | 0,06 | 0,22 | 0,04 | 0,20 | 0,06 | 0,19 | 0,07 | 0,019 | 0,08   |
| A4G4S4#41<br>[1878,21] <sup>2+</sup>  | 36,95<br>#41 | 0,55 | 0,17 | 0,53 | 0,11 | 0,52 | 0,15 | 0,47 | 0,11 | 0,137 | 0,22   |
| A4G4S4#42<br>[1878,21] <sup>2+</sup>  | 37,10<br>#42 | 0,32 | 0,09 | 0,29 | 0,07 | 0,35 | 0,11 | 0,31 | 0,09 | 0,574 | 0,41   |
| FA4G4S3#43<br>[1805,69] <sup>2+</sup> | 37,99<br>#43 | 0,48 | 0,13 | 0,39 | 0,13 | 0,46 | 0,16 | 0,40 | 0,19 | 0,387 | 0,22   |

**2. táblázat 2. sz. melléklet:** COVID-19 kohorton elvégzett TSNG analízis statisztikai eredményei. Glikánstruktúra neve#x [Elméleti m/z]<sup>2+</sup> (#x: glikán csúcs sorszáma a fluoreszcens kromatogramon), retenciós idő [perc], átlag RA% -és standard deviáció mintacsoportonként, Shapiro-Wilk normalitás teszt beteg és kontroll csoportra osztva nézve (konfidencia-intervallum: 95%), Kruskal-Wallis teszt szignifikancia szintjei (konfidencia-intervallum: 95%, p=0,05). C-O-: Covid-Oltás- mintacsoport; C-O+: Covid-Oltás+ mintacsoport; C+O-: Covid+Oltás- mintacsoport; C+O+: Covid+Oltás+ mintacsoport

| Glikánstruktúra<br>neve#x<br>[Elméleti m/z] <sup>2+</sup> | Retenciós<br>idő<br>[perc]<br>#x | Átlag<br>RA%<br>(C-O-) | Std.<br>dev. | Átlag<br>RA%<br>(C-O+) | Std.<br>dev. | Átlag<br>RA%<br>(C+O-) | Std.<br>dev. | Átlag<br>RA%<br>(C+O+) | Std.<br>dev. | Shapiro-<br>Wilk<br>Normalitás<br>teszt | Kruskal-<br>Wallis<br>(*p≤0,05;<br>**p≤0,01;<br>***p≤0,001) |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------|------------------------|--------------|------------------------|--------------|------------------------|--------------|------------------------|--------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| FA2#1<br>[841,94] <sup>2+</sup>                           | 13,30<br>#1                      | 4,29                   | 2,02         | 3,73                   | 1,09         | 3,88                   | 1,12         | 3,63                   | 1,55         | 0,046                                   | 0,794                                                       |
| M5#2<br>[727,89] <sup>2+</sup>                            | 14,67<br>#2                      | 2,55                   | 0,86         | 2,49                   | 0,43         | 2,33                   | 0,45         | 2,20                   | 0,54         | 0,001                                   | 0,361                                                       |
| FA2G1#3<br>[922,97] <sup>2+</sup>                         | 16,45<br>#3                      | 3,64                   | 0,93         | 3,74                   | 0,88         | 3,62                   | 0,61         | 3,37                   | 0,97         | 0,041                                   | 0,500                                                       |
| FA2G1#4<br>[922,97] <sup>2+</sup>                         | 16,91<br>#4                      | 1,73                   | 0,58         | 1,82                   | 0,48         | 1,62                   | 0,23         | 1,62                   | 0,37         | 0,049                                   | 0,701                                                       |
| FA2BG1#5<br>[1024,51] <sup>2+</sup>                       | 17,57<br>#5                      | 1,33                   | 0,36         | 1,38                   | 0,27         | 1,24                   | 0,32         | 1,20                   | 0,30         | 0,104                                   | 0,575                                                       |
| M6#6<br>[808,92] <sup>2+</sup>                            | 18,19<br>#6                      | 1,34                   | 0,41         | 1,47                   | 0,28         | 1,26                   | 0,26         | 1,25                   | 0,34         | 0,032                                   | 0,128                                                       |
| A2G2#7<br>[930,97] <sup>2+</sup>                          | 18,57<br>#7                      | 1,15                   | 0,33         | 1,27                   | 0,21         | 1,28                   | 0,26         | 1,20                   | 0,17         | 0,431                                   | 0,716                                                       |

|                                        |              |       |      |       |      |       |      |       |      |       |          |
|----------------------------------------|--------------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|----------|
| A2BG2#8<br>[1032,51] <sup>2+</sup>     | 19,43<br>#8  | 0,51  | 0,12 | 0,53  | 0,09 | 0,59  | 0,17 | 0,50  | 0,10 | 0,046 | 0,336    |
| FA2G2#9<br>[1004,00] <sup>2+</sup>     | 20,09<br>#9  | 3,04  | 0,84 | 3,54  | 1,07 | 2,93  | 0,51 | 2,93  | 0,81 | 0,001 | 0,208    |
| FA2BG2#10<br>[1105,54] <sup>2+</sup>   | 20,82<br>#10 | 2,33  | 0,36 | 2,43  | 0,27 | 2,30  | 0,37 | 2,18  | 0,34 | 0,894 | 0,320    |
| FA2G2S1#11<br>[1149,55] <sup>2+</sup>  | 21,94<br>#11 | 0,40  | 0,09 | 0,44  | 0,07 | 0,42  | 0,05 | 0,39  | 0,10 | 0,370 | 0,132    |
| A2G2S1#12<br>[1076,52] <sup>2+</sup>   | 22,28<br>#12 | 2,94  | 0,67 | 3,09  | 0,52 | 3,04  | 0,31 | 3,03  | 0,51 | 0,670 | 0,991    |
| A2G2S1#13<br>[1076,52] <sup>2+</sup>   | 22,47<br>#13 | 9,43  | 1,26 | 9,85  | 1,10 | 10,29 | 1,09 | 9,64  | 0,87 | 0,104 | 0,202    |
| A2FG2S1#14<br>[1149,55] <sup>2+</sup>  | 23,58<br>#14 | 0,69  | 0,44 | 0,56  | 0,24 | 0,71  | 0,27 | 0,56  | 0,20 | 0,001 | 0,224    |
| FA2G2S1#15<br>[1149,55] <sup>2+</sup>  | 23,88<br>#15 | 4,48  | 0,91 | 4,86  | 0,74 | 4,63  | 0,80 | 4,61  | 0,76 | 0,202 | 0,661    |
| FA2BG2S1#16<br>[1251,09] <sup>2+</sup> | 24,41<br>#16 | 0,60  | 0,10 | 0,64  | 0,13 | 0,68  | 0,18 | 0,63  | 0,14 | 0,715 | 0,246    |
| A2G2S2#17<br>[1222,06] <sup>2+</sup>   | 24,73<br>#17 | 2,82  | 0,66 | 3,28  | 0,70 | 3,02  | 1,19 | 2,90  | 0,65 | 0,154 | 0,229    |
| FA2BG2S1#18<br>[1251,08] <sup>2+</sup> | 24,89<br>#18 | 2,21  | 0,48 | 2,08  | 0,73 | 2,29  | 0,84 | 2,06  | 0,76 | 0,003 | 0,737    |
| FA2BG2S1#19<br>[1251,08] <sup>2+</sup> | 25,30<br>#19 | 0,57  | 0,12 | 0,65  | 0,08 | 0,54  | 0,07 | 0,53  | 0,15 | 0,373 | *0,013   |
| FA2BG2S1#20<br>[1251,08] <sup>2+</sup> | 25,91<br>#20 | 0,45  | 0,05 | 0,44  | 0,06 | 0,48  | 0,07 | 0,47  | 0,06 | 0,070 | 0,328    |
| A2G2S2#21<br>[1222,06] <sup>2+</sup>   | 26,30<br>#21 | 29,88 | 2,38 | 29,08 | 2,14 | 29,68 | 2,48 | 30,02 | 1,75 | 0,486 | 0,657    |
| A2G2S2#22<br>[1222,06] <sup>2+</sup>   | 26,65<br>#22 | 1,11  | 0,21 | 1,24  | 0,17 | 1,08  | 0,15 | 1,22  | 0,12 | 0,793 | *0,027   |
| FA2G2S2#23<br>[1295,09] <sup>2+</sup>  | 27,33<br>#23 | 0,55  | 0,17 | 0,48  | 0,13 | 0,65  | 0,21 | 0,37  | 0,14 | 0,019 | ***0,001 |
| FA2G2S2#24<br>[1295,09] <sup>2+</sup>  | 27,58<br>#24 | 4,09  | 0,95 | 3,83  | 0,94 | 4,10  | 0,97 | 4,28  | 0,96 | 0,003 | 0,545    |
| FA2BG2S2#25<br>[1396,63] <sup>2+</sup> | 28,07<br>#25 | 2,38  | 0,51 | 2,20  | 0,55 | 2,43  | 0,60 | 2,33  | 0,53 | 0,482 | 0,620    |
| A3G3S2#26<br>[1404,63] <sup>2+</sup>   | 28,66<br>#26 | 1,59  | 0,40 | 1,75  | 0,41 | 1,77  | 0,57 | 1,86  | 0,35 | 0,085 | 0,313    |
| A3G3S2#27<br>[1404,63] <sup>2+</sup>   | 29,02<br>#27 | 0,20  | 0,07 | 0,22  | 0,06 | 0,21  | 0,05 | 0,28  | 0,18 | 0,001 | 0,334    |
| A3G3S2#28<br>[1404,63] <sup>2+</sup>   | 30,03<br>#28 | 0,92  | 0,24 | 1,02  | 0,28 | 0,97  | 0,25 | 1,10  | 0,30 | 0,261 | 0,213    |
| A3G3S2#29<br>[1404,63] <sup>2+</sup>   | 30,03<br>#29 | 0,54  | 0,25 | 0,43  | 0,09 | 0,44  | 0,13 | 0,57  | 0,21 | 0,001 | 0,177    |
| FA3G3S2#30<br>[1477,66] <sup>2+</sup>  | 30,58<br>#30 | 1,14  | 0,25 | 1,16  | 0,22 | 1,17  | 0,23 | 1,10  | 0,28 | 0,530 | 0,969    |
| FA3G3S2#31<br>[1477,66] <sup>2+</sup>  | 31,09<br>#31 | 0,38  | 0,06 | 0,37  | 0,08 | 0,36  | 0,05 | 0,42  | 0,14 | 0,001 | 0,122    |
| A3G3S3#32                              | 31,94        | 4,33  | 1,08 | 4,17  | 1,22 | 4,54  | 1,75 | 5,01  | 0,99 | 0,267 | 0,174    |

|                                       |              |      |      |      |      |      |      |      |      |       |          |
|---------------------------------------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|----------|
| [1550,18] <sup>2+</sup>               | #32          |      |      |      |      |      |      |      |      |       |          |
| A3G3S3#33<br>[1550,18] <sup>2+</sup>  | 32,28<br>#33 | 0,32 | 0,09 | 0,33 | 0,08 | 0,30 | 0,08 | 0,35 | 0,09 | 0,007 | 0,349    |
| A4G4S2#34<br>[1587,20] <sup>2+</sup>  | 32,67<br>#34 | 0,33 | 0,09 | 0,34 | 0,10 | 0,28 | 0,09 | 0,39 | 0,12 | 0,621 | *0,027   |
| A4G4S2#35<br>[1587,20] <sup>2+</sup>  | 32,87<br>#35 | 0,44 | 0,13 | 0,41 | 0,14 | 0,43 | 0,14 | 0,53 | 0,20 | 0,001 | 0,165    |
| A3G3S3#36<br>[1550,18] <sup>2+</sup>  | 33,35<br>#36 | 1,53 | 0,38 | 1,28 | 0,31 | 1,31 | 0,40 | 1,69 | 0,52 | 0,025 | *0,045   |
| A3FG3S3#37<br>[1623,21] <sup>2+</sup> | 33,62<br>#37 | 2,23 | 0,89 | 2,05 | 0,69 | 1,91 | 0,88 | 1,97 | 0,55 | 0,049 | 0,454    |
| A3G3S3#38<br>[1550,18] <sup>2+</sup>  | 34,12<br>#38 | 0,76 | 0,24 | 0,71 | 0,22 | 0,66 | 0,16 | 0,96 | 0,25 | 0,152 | **0,009  |
| A4G4S3#39<br>[1155,50] <sup>2+</sup>  | 34,37<br>#39 | 0,25 | 0,14 | 0,20 | 0,09 | 0,18 | 0,11 | 0,17 | 0,09 | 0,087 | 0,253    |
| A4G4S3#40<br>[1155,50] <sup>2+</sup>  | 35,39<br>#40 | 0,29 | 0,09 | 0,22 | 0,08 | 0,20 | 0,05 | 0,30 | 0,10 | 0,018 | ***0,001 |
| A4G4S4#41<br>[1252,53] <sup>2+</sup>  | 35,57<br>#41 | 0,27 | 0,10 | 0,23 | 0,16 | 0,18 | 0,07 | 0,20 | 0,08 | 0,001 | *0,049   |

**3. táblázat\_2. sz. melléklet:** Appendicitis kohorton elvégzett TSNG analízis statisztikai eredményei. Glikánstruktúra neve#x [Elméleti m/z]<sup>2+</sup> (#x: glikán csúcs sorszáma a fluoreszcens kromatogramon), retenciós idő [perc], átlag RA% -és standard deviáció mintacsoportonként, Shapiro-Wilk teszt egész mintaszettre nézve (konfidencia-intervallum: 95%), Mann-Whitney U-teszt A/K csoportok között (konfidencia-intervallum: 99%, p=0,01), Kruskal-Wallis teszt A/NK/HK között (konfidencia-intervallum: 99%, p=0,01). A: Appendicitis mintacsoport, K: összes kontrollt tartalmazó mintacsoport, NK: normál kontroll mintacsoport, HK: hasfájós kontroll mintacsoport

| Glikánstruktúra<br>neve#x<br>[Elméleti m/z] <sup>2+</sup> | Retenciós<br>idő<br>[perc]<br>#x | RA%<br>(A) | Std.<br>dev. | RA%<br>(K) | Std. dev. | RA%<br>(NK) | Std.<br>dev. | RA%<br>(HK) | Std. dev. | Shapiro-Wilk<br>(*p<0,05;<br>**p<0,01) | Mann-Whitney<br>A/K<br>(**p<0,01;<br>***p<0,001) | Kruskal-Wallis<br>A/NK/HK<br>(**p<0,01;<br>***p<0,001) |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------|------------|--------------|------------|-----------|-------------|--------------|-------------|-----------|----------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| FA2#1<br>[841,94] <sup>2+</sup>                           | 15,06<br>#1                      | 4,15       | 1,94         | 4,47       | 1,11      | 4,50        | 1,07         | 4,37        | 1,29      | **1,47E-04                             | 0,04                                             | 0,111                                                  |
| M5#2<br>[727,89] <sup>2+</sup>                            | 16,13<br>#2                      | 1,02       | 0,37         | 0,85       | 0,17      | 0,83        | 0,17         | 0,90        | 0,18      | **6,50E-07                             | 0,01                                             | 0,025                                                  |
| FA2B#3<br>[943,48] <sup>2+</sup>                          | 16,35<br>#3                      | 0,73       | 0,28         | 0,89       | 0,23      | 0,90        | 0,25         | 0,85        | 0,18      | *1,19E-02                              | **0,001                                          | **0,006                                                |
| FA2G1#4<br>[922,97] <sup>2+</sup>                         | 17,58<br>#4                      | 3,67       | 1,32         | 4,28       | 0,87      | 4,20        | 0,86         | 4,54        | 0,89      | *1,71E-02                              | **0,006                                          | 0,016                                                  |
| FA2G1#5<br>[922,97] <sup>2+</sup>                         | 17,95<br>#5                      | 1,49       | 0,60         | 1,79       | 0,51      | 1,71        | 0,43         | 2,03        | 0,68      | **1,95E-03                             | **0,004                                          | **0,009                                                |
| FA2BG1#6                                                  | 18,60                            | 0,71       | 0,26         | 0,84       | 0,21      | 0,81        | 0,19         | 0,93        | 0,27      | 2,22E-02                               | **0,005                                          | 0,013                                                  |

|                                        |              |       |      |       |      |       |      |       |      |            |           |           |
|----------------------------------------|--------------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|------------|-----------|-----------|
| [1024,51] <sup>2+</sup>                | #6           |       |      |       |      |       |      |       |      |            |           |           |
| FA2BG1#7<br>[1024,51] <sup>2+</sup>    | 18,64<br>#7  | 0,40  | 0,13 | 0,30  | 0,07 | 0,29  | 0,07 | 0,31  | 0,07 | **3,06E-06 | ***<0,001 | ***<0,001 |
| M6#8<br>[808,91] <sup>2+</sup>         | 19,02<br>#8  | 0,95  | 0,33 | 0,86  | 0,20 | 0,84  | 0,19 | 0,92  | 0,20 | **4,55E-06 | 0,27      | 0,38      |
| A2G2#9<br>[930,97] <sup>2+</sup>       | 19,32<br>#9  | 1,03  | 0,28 | 1,39  | 0,22 | 1,41  | 0,23 | 1,30  | 0,19 | 1,52E-01   | ***<0,001 | ***<0,001 |
| A2BG2#10<br>[1032,51] <sup>2+</sup>    | 19,95<br>#10 | 0,20  | 0,05 | 0,20  | 0,05 | 0,19  | 0,05 | 0,23  | 0,06 | 7,26E-01   | 0,92      | 0,24      |
| A2G1S1#11<br>[995,49] <sup>2+</sup>    | 20,15<br>#11 | 0,30  | 0,12 | 0,26  | 0,08 | 0,25  | 0,08 | 0,30  | 0,07 | *1,25E-02  | 0,14      | 0,09      |
| FA2G2#12<br>[1003,92] <sup>2+</sup>    | 20,32<br>#12 | 2,95  | 0,93 | 3,94  | 0,84 | 3,84  | 0,82 | 4,28  | 0,86 | 6,02E-01   | ***<0,001 | ***<0,001 |
| A2G2S1#13<br>[1076,51] <sup>2+</sup>   | 20,86<br>#13 | 0,62  | 0,21 | 0,72  | 0,28 | 0,71  | 0,28 | 0,74  | 0,27 | 6,60E-02   | 0,12      | 0,24      |
| FA2BG2#14<br>[1105,53] <sup>2+</sup>   | 20,95<br>#14 | 0,61  | 0,23 | 0,66  | 0,24 | 0,66  | 0,25 | 0,65  | 0,20 | 1,32E-01   | 0,26      | 0,52      |
| M4G1S1#15<br>[974,97] <sup>2+</sup>    | 21,11<br>#15 | 0,73  | 0,17 | 0,89  | 0,13 | 0,87  | 0,12 | 0,96  | 0,15 | 7,77E-01   | ***<0,001 | ***<0,001 |
| M7#16<br>[889,94] <sup>2+</sup>        | 21,35<br>#16 | 0,13  | 0,05 | 0,18  | 0,07 | 0,19  | 0,07 | 0,17  | 0,05 | **1,34E-03 | **0,001   | **0,005   |
| M7#17<br>[889,94] <sup>2+</sup>        | 21,83<br>#17 | 0,12  | 0,03 | 0,19  | 0,04 | 0,19  | 0,04 | 0,18  | 0,02 | 2,13E-01   | ***<0,001 | ***<0,001 |
| A2G2S1#18<br>[1076,51] <sup>2+</sup>   | 22,30<br>#18 | 12,38 | 2,59 | 13,11 | 1,01 | 13,27 | 0,99 | 12,59 | 0,93 | **5,05E-10 | 0,07      | 0,06      |
| A2G2S1#19<br>[1076,51] <sup>2+</sup>   | 22,44<br>#19 | 0,25  | 0,06 | 0,55  | 0,09 | 0,55  | 0,09 | 0,58  | 0,04 | **1,44E-05 | ***<0,001 | ***<0,001 |
| A2FG2S1#20<br>[1149,54] <sup>2+</sup>  | 23,25<br>#20 | 4,09  | 0,93 | 5,19  | 0,70 | 5,11  | 0,67 | 5,46  | 0,76 | 3,60E-01   | ***<0,001 | ***<0,001 |
| FA2G2S2#21<br>[1295,09] <sup>2+</sup>  | 23,66<br>#21 | 0,62  | 0,16 | 0,74  | 0,13 | 0,74  | 0,13 | 0,72  | 0,16 | 2,17E-01   | **0,001   | **0,004   |
| A2G2S2#22<br>[1222,06] <sup>2+</sup>   | 23,98<br>#22 | 5,26  | 0,68 | 5,09  | 0,72 | 5,06  | 0,75 | 5,16  | 0,64 | 6,97E-01   | 0,34      | 0,59      |
| M8#23<br>[970,88] <sup>2+</sup>        | 24,22<br>#23 | 0,15  | 0,06 | 0,22  | 0,08 | 0,22  | 0,08 | 0,23  | 0,10 | *3,81E-03  | ***<0,001 | **0,001   |
| FA2G2S2#24<br>[1295,09] <sup>2+</sup>  | 24,76<br>#24 | 0,28  | 0,09 | 0,40  | 0,07 | 0,40  | 0,07 | 0,40  | 0,04 | 4,66E-01   | ***<0,001 | ***<0,001 |
| A2G2S2#25<br>[1222,06] <sup>2+</sup>   | 25,12<br>#25 | 34,95 | 3,90 | 29,61 | 1,94 | 29,52 | 1,77 | 29,91 | 2,51 | *1,56E-02  | ***<0,001 | ***<0,001 |
| FA2G2S2#26<br>[1295,09] <sup>2+</sup>  | 25,75<br>#26 | 0,71  | 0,29 | 1,09  | 0,23 | 1,07  | 0,23 | 1,14  | 0,21 | **7,54E-04 | ***<0,001 | ***<0,001 |
| FA2G2S2#27<br>[1295,09] <sup>2+</sup>  | 25,97<br>#27 | 3,16  | 0,64 | 3,28  | 0,87 | 3,31  | 0,95 | 3,19  | 0,53 | **6,10E-07 | 0,84      | 0,98      |
| FA2BG2S2#28<br>[1396,63] <sup>2+</sup> | 26,34<br>#28 | 0,89  | 0,30 | 1,09  | 0,30 | 1,02  | 0,23 | 1,34  | 0,36 | *2,24E-02  | **0,002   | **0,001   |
| A2BG3S2#29<br>[1404,63] <sup>2+</sup>  | 26,61<br>#29 | 1,37  | 0,34 | 1,77  | 0,32 | 1,81  | 0,33 | 1,61  | 0,27 | 1,12E-01   | ***<0,001 | ***<0,001 |
| A2BG3S2#30<br>[1404,63] <sup>2+</sup>  | 26,92<br>#30 | 0,24  | 0,08 | 0,23  | 0,03 | 0,22  | 0,03 | 0,24  | 0,04 | **1,73E-04 | 0,87      | 0,74      |



|                                               |              |      |      |      |      |      |      |      |      |            |           |           |
|-----------------------------------------------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------|-----------|-----------|
| <i>A2BG3S2#31</i><br>[1404,63] <sup>2+</sup>  | 27,75<br>#31 | 0,72 | 0,23 | 1,45 | 0,33 | 1,49 | 0,34 | 1,29 | 0,22 | **2,52E-03 | ***<0,001 | ***<0,001 |
| <i>FA3G3S2#32</i><br>[1477,65] <sup>2+</sup>  | 27,83<br>#32 | 0,44 | 0,15 | 0,58 | 0,20 | 0,59 | 0,22 | 0,53 | 0,14 | **1,14E-02 | **0,002   | **0,007   |
| <i>A3G3S3#33</i><br>[1550,17] <sup>2+</sup>   | 28,05<br>#33 | 0,56 | 0,29 | 0,65 | 0,17 | 0,66 | 0,19 | 0,62 | 0,10 | **2,62E-04 | 0,03      | 0,07      |
| <i>A3G3S3#34</i><br>[1550,18] <sup>2+</sup>   | 28,05<br>#34 | 0,59 | 0,19 | 0,17 | 0,09 | 0,18 | 0,10 | 0,14 | 0,06 | **9,41E-06 | ***<0,001 | ***<0,001 |
| <i>A3G3S3#35</i><br>[1550,18] <sup>2+</sup>   | 28,40<br>#35 | 0,34 | 0,19 | 0,20 | 0,07 | 0,20 | 0,08 | 0,20 | 0,08 | **1,67E-05 | **0,001   | **0,004   |
| <i>A3G3S3#36</i><br>[1550,18] <sup>2+</sup>   | 28,97<br>#36 | 4,43 | 1,20 | 4,38 | 1,03 | 4,47 | 1,07 | 4,10 | 0,88 | 2,25E-01   | 0,86      | 0,56      |
| <i>A4G4S2#37</i><br>[1587,19] <sup>2+</sup>   | 29,24<br>#37 | 0,83 | 0,31 | 0,68 | 0,19 | 0,71 | 0,17 | 0,59 | 0,23 | *1,43E-02  | 0,05      | 0,07      |
| <i>FA3G3S3#38</i><br>[1623,20] <sup>2+</sup>  | 29,52<br>#38 | 0,33 | 0,11 | 0,38 | 0,11 | 0,39 | 0,11 | 0,34 | 0,10 | 2,22E-01   | 0,10      | 0,15      |
| <i>A3G3S3#39</i><br>[1550,18] <sup>2+</sup>   | 30,01<br>#39 | 1,22 | 0,43 | 1,12 | 0,36 | 1,14 | 0,39 | 1,04 | 0,23 | 2,31E-01   | 0,21      | 0,38      |
| <i>FA3G3S3#40</i><br>[1623,20] <sup>2+</sup>  | 30,10<br>#40 | 2,57 | 1,36 | 1,99 | 0,62 | 2,01 | 0,67 | 1,91 | 0,41 | **4,28E-07 | 0,04      | 0,11      |
| <i>A4G4S3#41</i><br>[1732,74] <sup>2+</sup>   | 30,34<br>#41 | 0,84 | 0,30 | 0,90 | 0,21 | 0,93 | 0,21 | 0,77 | 0,15 | 9,80E-01   | 0,28      | 0,08      |
| <i>FA3FG3S3#42</i><br>[1696,24] <sup>2+</sup> | 30,53<br>#42 | 0,16 | 0,11 | 0,13 | 0,07 | 0,13 | 0,08 | 0,10 | 0,03 | **1,76E-07 | 0,18      | 0,30      |
| <i>A4G4S3#43</i><br>[1732,74] <sup>2+</sup>   | 31,20<br>#43 | 0,54 | 0,23 | 0,54 | 0,12 | 0,56 | 0,12 | 0,49 | 0,08 | **3,09E-03 | 0,48      | 0,24      |
| <i>A4G4S4#44</i><br>[1878,29] <sup>2+</sup>   | 31,50<br>#44 | 0,64 | 0,28 | 0,56 | 0,16 | 0,58 | 0,17 | 0,51 | 0,13 | *1,52E-02  | 0,46      | 0,48      |
| <i>A4G4S4#45</i><br>[1878,29] <sup>2+</sup>   | 32,20<br>#45 | 0,66 | 0,33 | 0,53 | 0,15 | 0,54 | 0,16 | 0,50 | 0,13 | **4,33E-05 | 0,15      | 0,29      |
| <i>A4G4S4#46</i><br>[1878,29] <sup>2+</sup>   | 32,40<br>#46 | 0,34 | 0,19 | 0,26 | 0,08 | 0,26 | 0,09 | 0,26 | 0,09 | **9,90E-07 | 0,1       | 0,25      |
| <i>FA4G4S4#47</i><br>[1951,32] <sup>2+</sup>  | 33,01<br>#47 | 0,45 | 0,35 | 0,32 | 0,12 | 0,32 | 0,13 | 0,30 | 0,09 | **1,41E-09 | 0,34      | 0,61      |
| <i>FA4G4S4#48</i><br>[1951,32] <sup>2+</sup>  | 33,67<br>#48 | 0,14 | 0,09 | 0,12 | 0,03 | 0,12 | 0,03 | 0,10 | 0,01 | **1,37E-08 | 0,54      | 0,27      |