



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

Tézisfüzet

Készítette:

Dojcsák Dalma

Okleveles biomérnök

Tudományos vezető:

Dr. Váradi Csaba

Miskolc

2026

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	- 1 -
2. Célkitűzések	3
3. Módszerek	4
Kísérleti munkafolyamatok	4
Adatelemzés.....	5
4. Tézisek	6
5. Értekezés alapjául szolgáló közlemények	12
6. További, referált folyóiratokban megjelent közlemények	12
7. További, nem referált folyóiratban megjelent közlemény	13
8. Összefoglalás.....	14
9. Summary	15
10. Irodalomjegyzék.....	17

1. Bevezetés

A glikoziláció a fehérjékhez kapcsolódó kovalens kémiai módosulás, amely során oligoszacharid (glikán) egységek épülnek be a polipeptid lánc meghatározott funkciós csoportjaihoz, kompozit makromolekulákat, úgynevezett glikoproteineket létrehozva. A glikánok szerkezeti komplexitása, elágazottsága és konformációs variabilitása jelentős mértékben befolyásolja a fehérjék fizikokémiai tulajdonságait. A glikoziláció nem templátvezérelt folyamat, hanem egy enzimatikusan katalizált, környezetfüggő kémiai módosulás, amit a sejt lokális összetétele, enzimaktivitása és metabolikus állapota határoz meg. Emiatt a glikánstruktúrák összetétele és mennyiségi aránya érzékeny a sejtek kémiai környezetének változásaira, ami a glikánokat alkalmassá teszi állapotfüggő molekuláris jelzőként való alkalmazásra [1]. A fehérjék N-glikozilációja pontosan jellemzi a gyulladásos állapotokat, így vizsgálata kiemelt jelentőségű [2, 3].

Az N-glikánok analitikai elemzésében a nagy felbontású szeparációs technikák, mint a kapilláris elektroforézis és a fluoreszcens detektorral kapcsolt folyadékkromatográfia (LC-FLD), kiemelkedő reprodukálhatóságot biztosítanak. Tömegspektrometriával (MS) kombinálva ezek a módszerek részletes szerkezeti információt szolgáltatnak a glikánmintázatokról [4, 5]. A glikánanalízis megbízhatóságát döntően meghatározza a mintaelőkészítési lépések minősége, különösen a glikánok tisztítása, amely továbbra is a glikoanalitika egyik kritikus szűk keresztmetszete. A többlépéses tisztítási eljárások során különösen fontos a mintaveszteség minimalizálása és a feldolgozási idő csökkentése. Az utóbbi években a szilárd fázisú extrakcióra (SPE) épülő megoldások, különösen a mágneses nanorészecskéken (MNP) alapuló módszerek kerültek előtérbe [6, 7]. Ezek a technikák centrifugálás nélkül, mágneses tér segítségével tisztítják a glikánokat, ami gyorsaságot, egyszerűséget és automatizálhatóságot tesz lehetővé. Az MNP-k nagy fajlagos felületük és könnyen módosítható felszínük miatt különösen ígéretesek a glikánok célzott és hatékony tisztításában [7-9]. Ennek ellenére a különböző diszperziós közegek, elúciós feltételek és ferit-alapú MNP-típusok N-glikán-megkötési tulajdonságaira vonatkozó szisztematikus összehasonlító vizsgálatok, valamint az eljárások robotizált rendszerekbe történő integrálása eddig kevés figyelmet kapott.

Az N-glikánok szerkezeti mintázatának és relatív arányainak változásai rendszerszintű információt hordoznak a szervezet állapotáról, ezért a teljes szérum N-glikozilációjának vizsgálata átfogó képet ad a fiziológiai és patológiai folyamatokról [1, 2, 10, 11]. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy sclerosis multiplexben és COVID-19 fertőzésben a szérum N-

glikozilációs mintázata jelentősen megváltozik [12-20]. Ezek a tanulmányok azonban a sclerosis multiplex esetében nem fókuszálnak a nem szerinti csoportosításra, ami fontos irányt és releváns különbségeket mutathat, mivel nők esetében háromszor gyakoribb a diagnosztikai potenciál a férfiakhoz képest [21]. Mindezek mellett számos olyan betegség van, ami kevesebb figyelmet kapott glikomikai szempontból. Az akut vakbélgyulladás glikozilációs jellemzői jelenleg feltérképezetlenek, annak ellenére, hogy a biomarker alapú differenciáldiagnosztika, klinikai szempontból kiemelt jelentőséggel bír [22, 23].

PhD értekezésben egy új, ferrit-alapú MNP-re épülő N-glikán tisztítási protokoll kidolgozásának és optimalizálásának eredményeit mutatom be, különös tekintettel a kötési és elúciós feltételekre, valamint a módszer automatizálhatóságára. Emellett három, gyulladásos betegség - sclerosis multiplex, COVID-19 és akut vakbélgyulladás - teljes szérum N-glikozilációs analízisét végeztem el, új megközelítéseket alkalmazva és eddig nem ismert N-glikozilációs sajátosságokat feltárva.

2. Célkitűzések

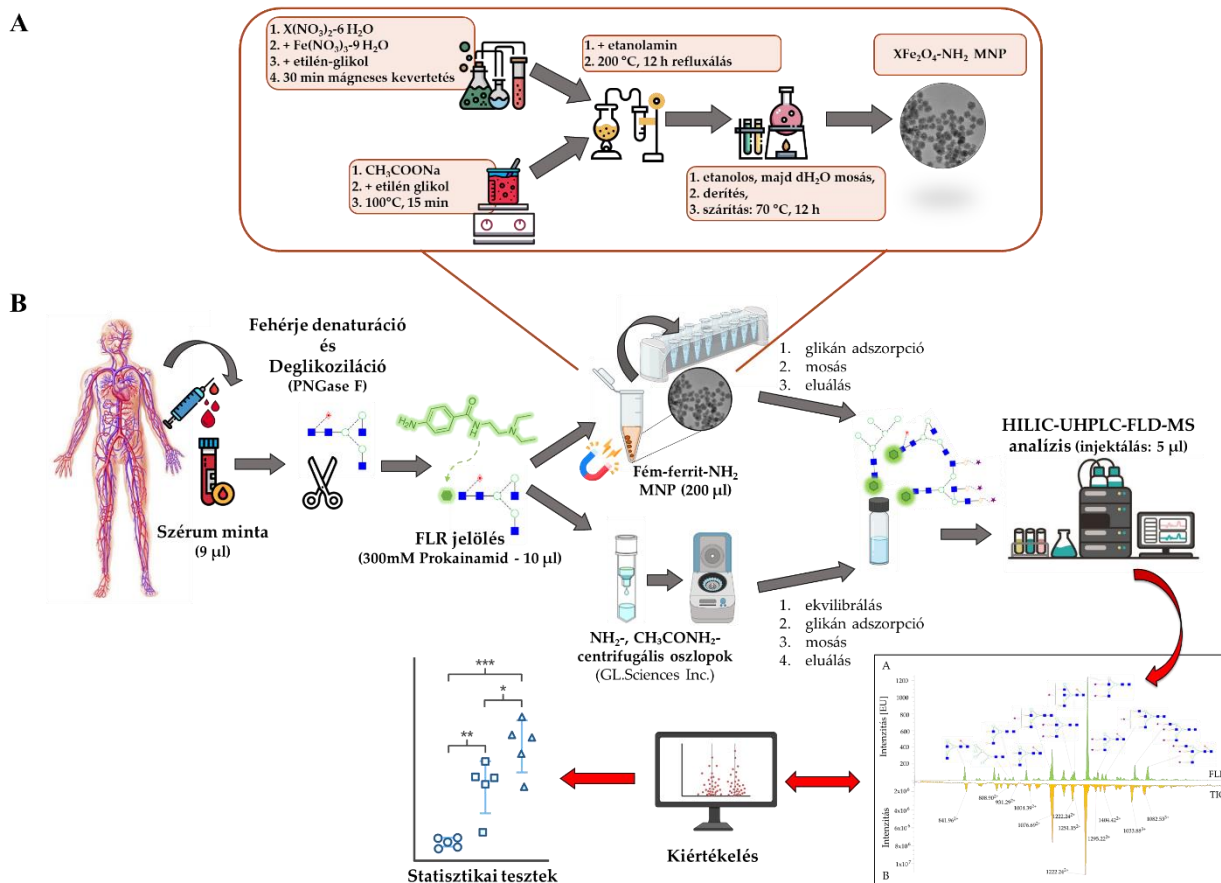
A PhD disszertációmban bemutatott kutatás elsődleges célja, egy mágneses nanorészecske alapú, költséghatékony és automatizálható glikán tisztítási protokoll kidolgozása, amely alkalmas szérumból származó fehérjék N-glikozilációs mintázatának vizsgálatára. A kutatásom további célja volt, hogy három különböző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

- 1. Újonnan szintetizált NH₂-funkcionalizált MNP-alapú glikán tisztítási módszer fejlesztése:** Négyféle NH₂-funkcionalizált, különböző ferrit-alapú nanorészecske N-glikánok felületi adszorpcióján alapuló megkötési hatékonyságának tesztelése ultranagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (UHPLC) rendszerben, a legrobustusabb MNP kiválasztása céljából.
- 2. MNP-platform optimalizálása költséghatékonyság és automatizálhatóság szempontjából:** A leghatékonyabb NH₂-funkcionalizált ferrit-alapú MNP kiválasztása, majd annak glikán adszorpció teljesítmény növelése szempontjából történő optimalizálás. A diszperziós közeg, az MNP koncentráció és az elúciós pufferek tesztelése. Az optimalizált MNP-protokoll összevetése kereskedelmi forgalomban kapható glikántisztítási módszerrel glikánkötési és költséghatékonyági szempontból. Végül a módszer integrálása egy automatizálható platformra.
- 3. Gyulladásos betegségek - 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.

3. Módszerek

Kísérleti munkafolyamatok

A munkámhoz NH_2 -funkcionalizált ferrit alapú mágneses nanorészecskéket állítottam elő koprecipitációs eljárással (Co-, Ni-, Mn-, Mg-ferritek), majd a részecskéket különböző diszperziós állapotokban (szárított/vizes/glikolos) alkalmaztam és optimalizáltam N-glikán tisztításra. Humán szérummintákból az N-glikánokat PNGase F enzimmel emésztettem le, majd prokainamid alapú redukzív aminálással (2-ProA) fluoreszcensen jelöltem. A jelölést követően a glikánokat NH_2 -funkcionalizált MNP-alapú saját fejlesztésű módszerrel vagy $\text{NH}_2/\text{CH}_3\text{CONH}_2$ MonoSpin centrifugális oszlopos készlettel tisztítottam (kondicionálás-adszorpció-mosás-elúció). Továbbá az MNP-protokollt Hamilton Microlab Prep platformra automatizáltam 96-lyukú Hamilton PCR lemez alkalmazásával. A glikán analízist HILIC-UHPLC-FLD-MS rendszereken végeztem (Waters ACQUITY folyadékkromatográfiás berendezés - SQD tömegspektrométer, illetve Waters ACQUITY H-class folyadékkromatográfiás berendezés - Xevo G2-XS QToF tömegspektrométer; Waters BEH Glycan Amid oszlop). Az analitikai elválasztást követően kapott fluoreszcens kromatogramokat Empower 3 (Waters ACQUITY - SQD rendszer) vagy MassLynx 4.2. verziójú (ACQUITY H-class - Xevo G2-XS QToF rendszer) kromatográfiás vezérlőszoftverek segítségével értékeltem ki és határoztam meg a csúcs alatti területek százalékos eloszlását, glikáncsúcsok intenzitását és a szabad fluoreszcens festék intenzitását.



1. ábra: Kísérleti munkafolyamatok ábrázolása N-glikozilációs mintázatok elemzésére (A) MNP koprecipitációs szintézis módszerének lépései; (B) szérum N-glikánok mintaelőkészítési és elemzési lépései.

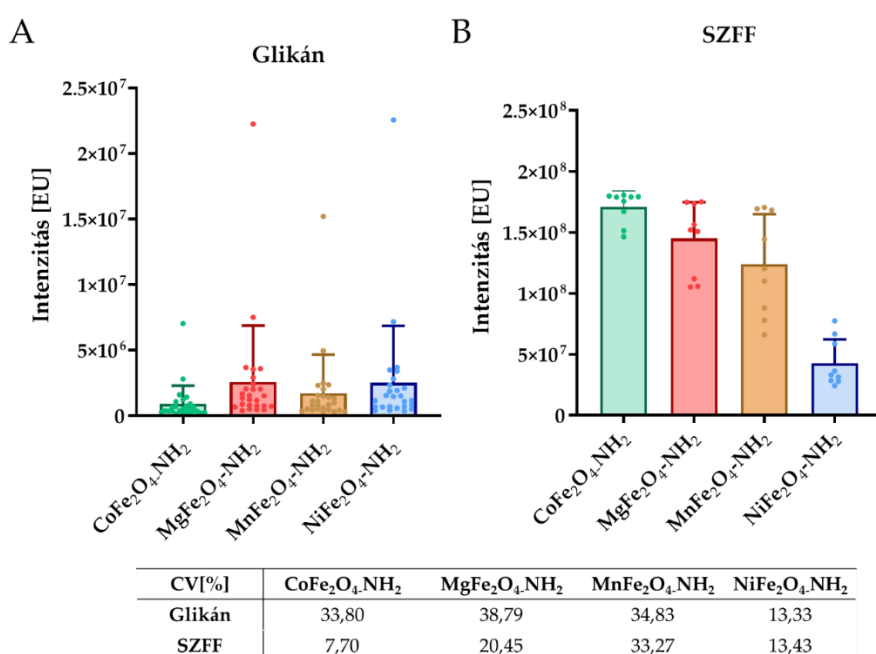
Adatelemzés

A mintacsoportok közötti N-glikozilációs mintázatok összehasonlítását többváltozós statisztikai módszerekkel végeztem. Az adatok normalitását Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztem, majd nem normális eloszlás esetén Mann-Whitney U- és Kruskal-Wallis-próbát alkalmaztam a szignifikáns különbségek azonosítására. A glikánok diagnosztikai potenciálját ROC-analízissel (AUC) értékeltem, míg a mintacsoportok elkülönítését és a legfontosabb diszkrimináló glikánok azonosítását lineáris diszkrimináns analízissel (LDA) végeztem. A korrelációs vizsgálatokhoz Spearman- és Point-Biserial korrelációt alkalmaztam. Az adatok feldolgozását és vizualizációját IBM SPSS Statistics 25, Past 4.02, GraphPad Prism 10.1.2 és Python 3.10 szoftverekkel, míg a glikánszerkezetek MS-alapú azonosítását GlycoWorkbench 2.1. szoftverben végeztem.

4. Tézisek

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.

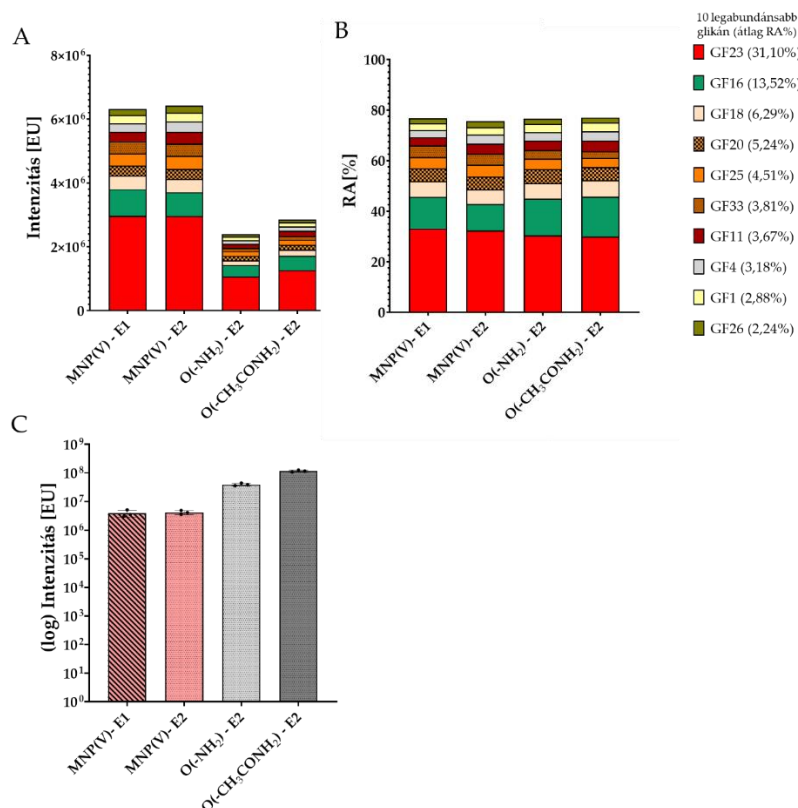
Alátámasztás: Eredményeim megbízhatóságát a $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-protokollhoz tartozó glikánintenzitások 13,33% relatív szórása (CV), valamint a szabad fluoreszcens festék (SZFF) intenzitásának 13,43% CV értéke támasztja alá, amelyek a módszer jó reprodukálhatóságát igazolják. A különböző ferrit-alapú protokollok közötti analitikai összehasonlíthatóságot a kromatogramon megjelenő glikáncsúcsok konzisztens relatív százalékos eloszlása biztosítja.



2. ábra: A NH_2 -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.

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 CH_3CONH_2 - és NH_2 -funkcionalizált centrifugális oszlopokat szérumból származó N-glikánok megkötése során.

Alátámasztás: A $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ típusú MNP glikoanalitikai alkalmazhatóságát a diszperziós közeg (szárított, glikolos és vizes), a részecskekoncentráció és az elúciós puffer szisztematikusan optimalizálásával vizsgáltam. Eredményeim igazolták, hogy a vizes diszperziós közeg 0,5 mg/ml MNP koncentrációja, biztosítja a legjobb glikán kötő teljesítményt N-glikán tisztítás során, mivel közel kétszeres glikánintenzitás-növekedést eredményezett a szárított és a glikolos MNP-rendszerekhez képest. Továbbá az optimalizált 0,5 mg/ml $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (V) MNP protokoll körülbelül háromszoros összglykán-intenzitás növekedést és tízszeres SZFF intenzitáscsökkenést mutatott a kereskedelmi forgalomban elérhető, centrifugális CH_3CONH_2 - és NH_2 -funkcionalizált oszlopokhoz képest (3. ábra A, C). Mindezek mellett a protokollok között a konzisztens glikáncsúcsok százalékos eloszlása (relatív abundancia vagy RA%) igazolja, hogy az adszorpciós teljesítménykülönbségek nem a mérési variabilitásból, hanem a mintaelőkészítés hatékonyságából erednek (3. ábra B). Továbbá a Disszertációban bemutatott 3. táblázatban feltüntetett költségek összehasonlítása alapján, igazolható, hogy az MNP-alapú protokoll költséghatékonyabb, mint a kereskedelmi forgalomban kapható, NH_2 - és CH_3CONH_2 -funkcionalizált MonoSpin oszlopos vagy mágneses gyöngy alapú, glikán mintaelőkészítésre alkalmas készletek.

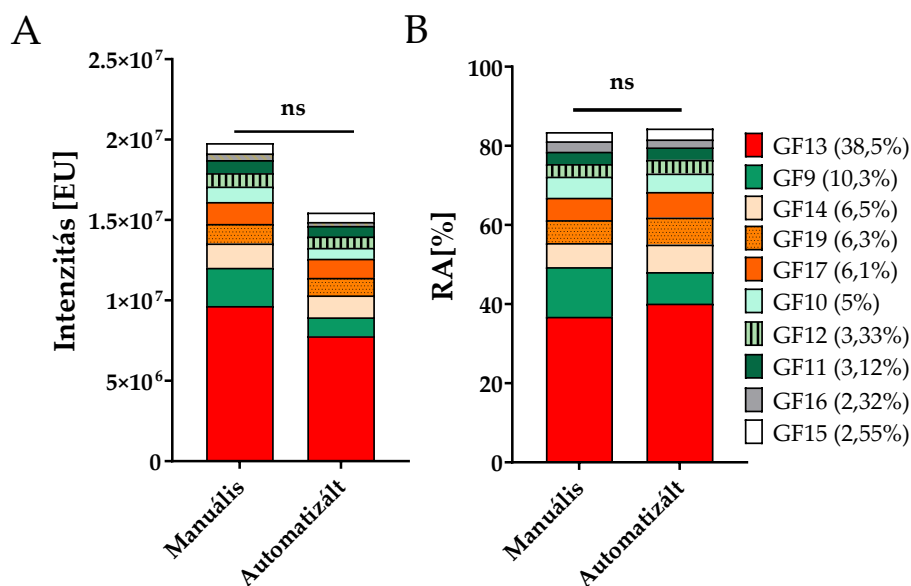


3. ábra: Elúciós pufferek hatékonyságának vizsgálata: MNP-alapú, valamint kereskedelmi forgalomban kapható NH_2 -vagy CH_3CONH_2 -funkcionalizált oszlopok glikán tisztítási teljesítményének összehasonlítása a tíz legabundánsabb glikoformára jellemző glikán csúcs intenzitások, RA% és SZFF intenzitás alapján. (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 ammóniumformiát 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.

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 maradjon.

Alátámasztás: Az MNP-alapú N-glikán tisztítási protokoll automatizált folyadékkezelő robotikus platformra történő implementálhatóságát a manuális és automatizált mintaelőkészítések összehasonlító elemzésével igazoltam. Eredményeim alapján a glikánintenzitás-értékek nem mutattak szignifikáns eltérést a két kivitelezési mód között, ami a megkötési hatékonyság megőrzését jelzi automatizált környezetben is. A glikáncsúcsok RA% eloszlásának egyezése a manuális és automatizált mintaelőkészítés során igazolta, hogy az

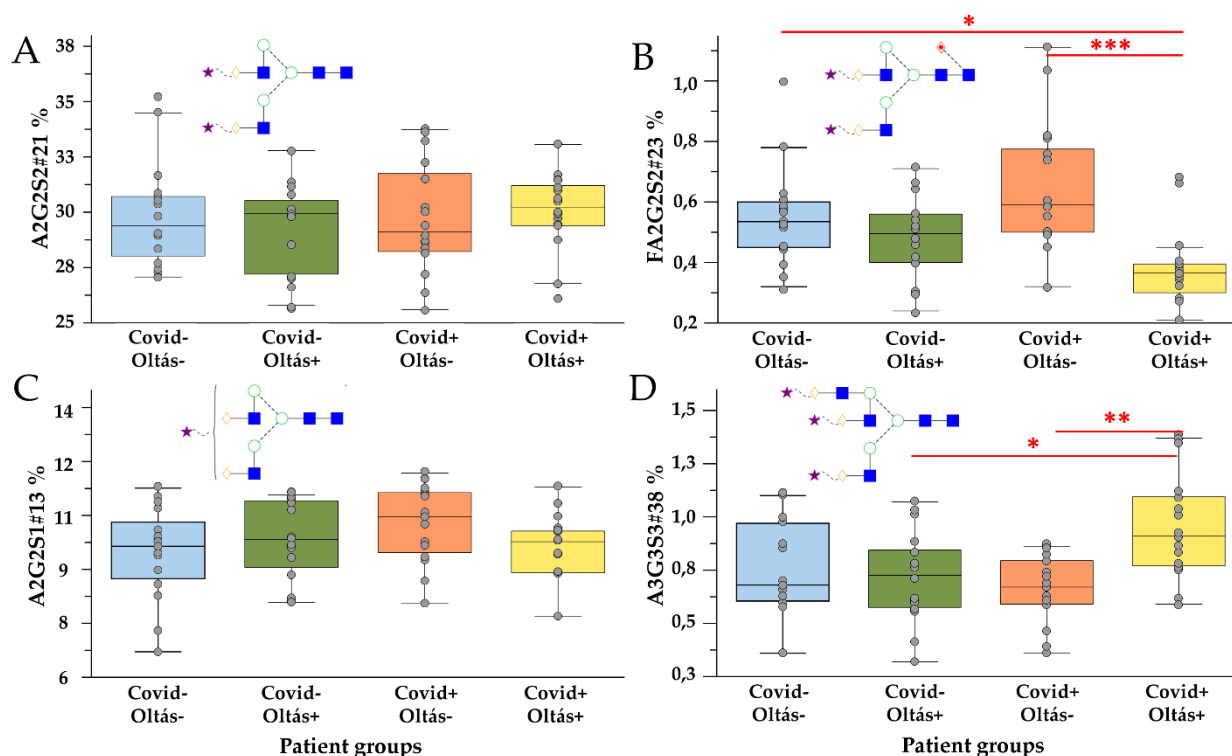
automatizált műveletek nem növelik a módszer varianciáját, ezáltal az MNP-alapú N-glikán tisztítás megbízhatóan és reprodukálható módon alkalmazható folyadékkezelő robotikus platformon.



4. 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.

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 szíalsavtartalmú glikánstruktúrák szializáltsági fokának szignifikáns növekedése jellemzi.

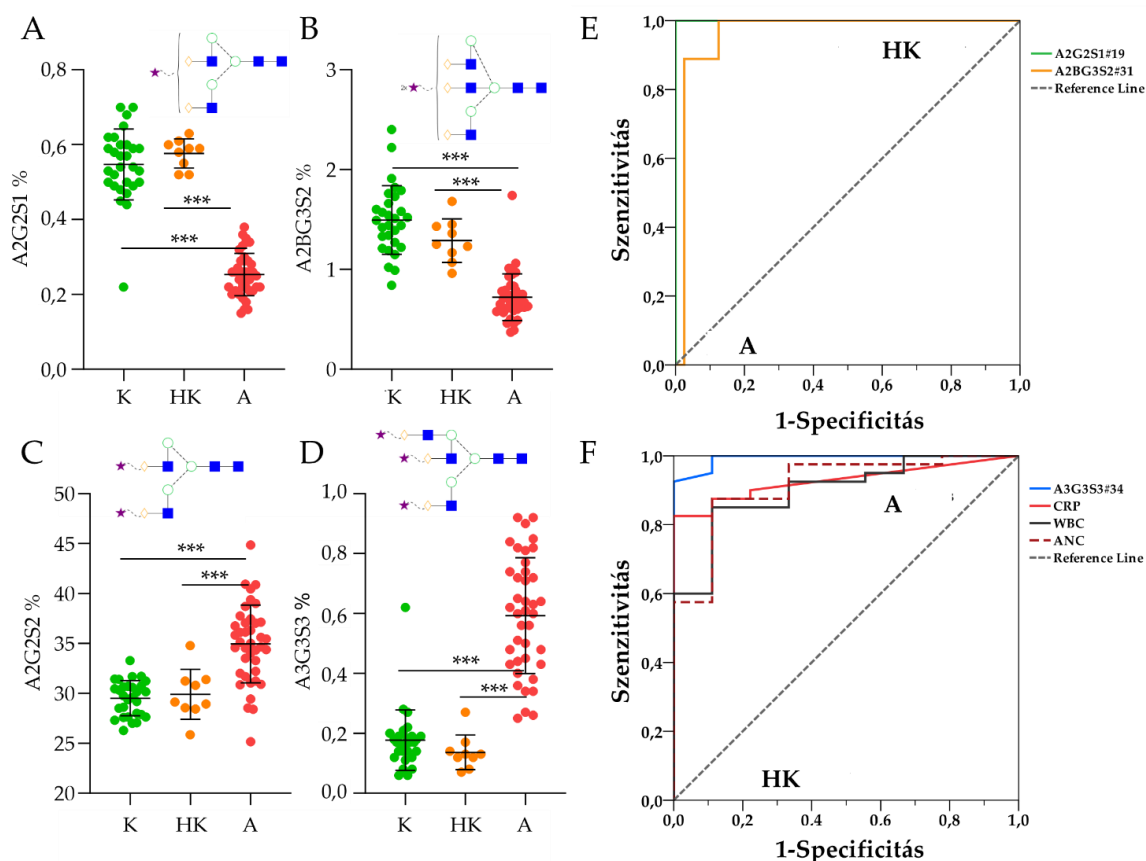
Alátámasztás: A COVID-19 fertőzésen való átesettség vagy az oltottság hatására megjelenő specifikus antitestek jelenlétét klinikai és kereskedelmi forgalomban kapható immunoassay teszttel támasztottam alá. A Pfizer-BioNTech mRNS-alapú vakcináció N-glikozilációra gyakorolt hatását kizárólag a COVID-19-en átesett mintacsoportokban figyeltem meg, amelyet a FA2G2S2 struktúra RA% értékének változása támaszt alá. A COVID-19-en átesett és nem oltott egyénekben az FA2G2S2 struktúra szignifikáns emelkedése ($p=0,02$) figyelhető meg, míg az átesett és oltott mintacsoportban a szignifikáns csökkenést ($p<0,001$) figyeltem meg (5. ábra B). Ez a változás a fukoziláció alacsonyabb arányát és az effektor immunválasz aktiválódását jelzi. Ezzel párhuzamosan a magasabb szíalsav tartalmú cukrok (A3G3S3) relatív emelkedése ($p=0,01$), a szializáltsági fok fokozódását, valamint az immunválasz kontrollált lecsengését tükrözi (5. ábra D).



5. 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: A3G3S3#38 (RT: 34,12; $[1550,18]^{2+}$; $p=0,046$; $p=0,01$).

5. Gyermekkori akut vakbélgyulladásban az integrált adatelemzési módszerek alkalmazása erős és szignifikáns korrelációt igazol a klinikai paraméterek (CRP, abszolút neutrofilszám, fehérvérsejtszám) és a szérumban N-glikánstruktúrák között. A vakbélgyulladásos és a nem specifikus hasi fájdalommal járó mintacsoportok a szérumban glikoproteineket jellemző N-glikán szializációs fok alapján elkülönülnek.

Alátámasztás: Gyermekkori akut vakbélgyulladásban integrált adatelemzési módszerekkel igazoltam, a klinikai paraméterek (CRP, fehérvérsejtszám –WBC, abszolút neutrofilszám - ANC,) és a szérumban N-glikánstruktúrák között erős korreláció ($R>0,7$, $p<0,001$) áll fenn. Az így kialakított kombinált adatelemzési megközelítés validálására ROC analízist végeztem, amely során a monoszializált (A2G2S1) és triszializált (A3G3S3) glikánstruktúrák, valamint klinikai laborparaméterek (CRP, WBC, ANC) 0,8 feletti görbe alatti területet ($AUC>0,8$) és 0,9-1 közötti konfidencia intervallumot mutattak, szignifikáns elkülönítést biztosítva ($p<0,001$) a vakbélgyulladásos és a nem specifikus hasi fájdalommal jelentkező mintacsoportok között.



Teszt változó	AUC	Std. deviáció	Aszimptotikus szignifikancia ^b	Aszimptotikus 99%-os konfidencia 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

6. 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%.

5. 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). NH₂-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>

6. 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 specifitás javítása mágneses nanorészecskék alkalmazásával. *Doktorandusz Almanach*, 1, 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 folyadékromatográfiával és tömegspektrometriával. *Doktorandusz Almanach*, 1, 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. <https://doi.org/10.3390/ijms23095081>

7. 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.

8. 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 disszertáció egyik fő 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 hidrofíl kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfiát fluoreszcens detektálással és tömegspektrometriával kapcsolva (HILIC-UHPLC-FLD-MS) alkalmaztam a glikozilációs mintázatok elemzésére.

A disszertáció első részében részletesen bemutattam az MNP-alapú N-glikán-tisztítási protokoll fejlesztését és optimalizálását. A különböző ferrit-alapú, NH_2 -funkcionalizált MNP-k összehasonlítása során megállapítottam, hogy a $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ 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 glikán visszanyerést, 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.

A disszertáció második részében 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 mintázatok, ahol a szializáció és fukoziláció arányai bizonyultak meghatározó elkülönítő tényezőknél. 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.

9. 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, NH₂-functionalized MNPs, NiFe₂O₄–NH₂ 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.

10. Irodalomjegyzék

1. Hirata, T. and Y. Kizuka, *N-Glycosylation*, in *The Role of Glycosylation in Health and Disease*, G. Lauc and I. Trbojević-Akmačić, Editors. 2021, Springer International Publishing: Cham. p. 3-24.
2. Schjoldager, K.T., et al., *Global view of human protein glycosylation pathways and functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(12): p. 729-749.
3. Varki, A., *Biological roles of glycans*. Glycobiology, 2016. **27**(1): p. 3-49.
4. de Haan, N., et al., *Glycomics studies using sialic acid derivatization and mass spectrometry*. Nature Reviews Chemistry, 2020. **4**(5): p. 229-242.
5. Mariño, K., et al., *A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze*. Nature Chemical Biology, 2010. **6**(10): p. 713-723.
6. Issa, B., et al., *Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(11): p. 21266-21305.
7. Stueber, D.D., et al., *Magnetic Nanoparticles in Biology and Medicine: Past, Present, and Future Trends*. Pharmaceutics, 2021. **13**(7): p. 943.
8. Váradi, C., et al., *Purification of Fluorescently Derivatized N-Glycans by Magnetic Iron Nanoparticles*. Nanomaterials, 2019. **9**(10): p. 1480.
9. Kuo, C.-W., et al., *Rapid glycopeptide enrichment and N-glycosylation site mapping strategies based on amine-functionalized magnetic nanoparticles*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012. **402**(9): p. 2765-2776.
10. Reily, C., et al., *Glycosylation in health and disease*. Nature Reviews Nephrology, 2019. **15**(6): p. 346-366.
11. Pongracz, T., O.A. Mayboroda, and M. Wuhrer, *The Human Blood N-Glycome: Unraveling Disease Glycosylation Patterns*. JACS Au, 2024. **4**(5): p. 1696-1708.
12. Pongracz, T., et al., *Immunoglobulin G1 Fc glycosylation as an early hallmark of severe COVID-19*. eBioMedicine, 2022. **78**.
13. Pongracz, T., G. Vidarsson, and M. Wuhrer, *Antibody glycosylation in COVID-19*. Glycoconjugate Journal, 2022. **39**(3): p. 335-344.
14. Bladergroen, M.R., et al., *Total plasma N-glycomic signature of SARS-CoV-2 infection*. iScience, 2024. **27**(7): p. 110374.
15. Van Coillie, J., et al., *Comparative analysis of spike-specific IgG Fc glycoprofiles elicited by adenoviral, mRNA, and protein-based SARS-CoV-2 vaccines*. iScience, 2023. **26**(9): p. 107619.
16. Beimdiek, J., et al., *Plasma markers of COVID-19 severity: a pilot study*. Respiratory Research, 2022. **23**(1): p. 343.
17. Cvetko, A., et al., *Glycosylation Alterations in Multiple Sclerosis Show Increased Proinflammatory Potential*. Biomedicines, 2020. **8**(10): p. 410.
18. Decker, Y., et al., *Abnormal galactosylation of immunoglobulin G in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients*. Multiple Sclerosis Journal, 2016. **22**(14): p. 1794-1803.

19. Kennedy, P.G.E., et al., *Aberrant Immunoglobulin G Glycosylation in Multiple Sclerosis*. J Neuroimmune Pharmacol, 2022. **17**(1-2): p. 218-227.
20. Wuhrer, M., et al., *Pro-inflammatory pattern of IgG1 Fc glycosylation in multiple sclerosis cerebrospinal fluid*. Journal of Neuroinflammation, 2015. **12**(1): p. 235.
21. Thompson, A.J., et al., *Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria*. The Lancet Neurology, 2018. **17**(2): p. 162-173.
22. McCarthy, C., et al., *The Role and Importance of Glycosylation of Acute Phase Proteins with Focus on Alpha-1 Antitrypsin in Acute and Chronic Inflammatory Conditions*. Journal of Proteome Research, 2014. **13**(7): p. 3131-3143.
23. Gudelj, I., et al., *Changes in total plasma and serum N-glycome composition and patient-controlled analgesia after major abdominal surgery*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 31234.