

FEHÉRJÉK GLIKOZILÁCIÓJÁNAK NYOMON KÖVETÉSE ÉS  
PEPTIDEK ANALITIKAI ELVÁLASZTÁSÁNAK VIZSGÁLATA  
KAPILLÁRIS ELEKTROFORETIKUS MÓDSZEREKKEL

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Készítette

**Olajos Marcell**

okleveles környezetmérnök

Témavezető

**Dr. Hajós Péter**

egyetemi docens

Készült a Kémiai és Környezettudományok Doktori Iskola keretében

Pannon Egyetem

Mérnöki Kar

Analitikai Kémia Intézeti Tanszék

2010

## 1. Bevezetés és célkitűzések

2004-ben, mint Tudományos Diákköri hallgató kapcsolódtam be az Analitikai Kémia Tanszék egyik fő kutatási témakörébe, a nagyhatékonyságú analitikai elválasztási módszerek fizikai-kémiai alapjainak kutatásába, módszereinek fejlesztésébe és analitikai alkalmazásaiba. Munkámban külön motivációt jelentettek a doktori iskola elválasztástudomány területén elért nemzetközileg is elismert eredményei, diákkörös és PhD hallgatótársaim sikerei, illetve a lehetőség, hogy rangos nemzetközi kutatóhelyekkel együttműködésben folytathattam kutatómunkám.

Az új, korszerű, nagyhatékonyságú bioanalitikai módszerek segítséget nyújthatnak az élő szervezetek felépítő molekulák és azok komplex összefüggéseinek megismerésében, elvezetve a genomikai érából a proteomika és metabolomika korszakába, új perspektívákat nyitva a modern rendszerbiológia, élettudományok, biotechnológia és biofarmakológia előtt.

Munkám célja analitikai módszer kidolgozása volt fehérjék glikozilációjának vizsgálatára, elsősorban a komplexebb szerkezetű N-glikoziláció szénhidrát szerkezeteinek analízisére. Megvizsgáltam továbbá a kapilláris zóna elektroforézises peptid elválasztások előrejelzésére szolgáló modelleket, abból a célból, hogy a nagyhatékonyságú elválasztások egyszerűen optimalizálhatóak, megbízhatóan tervezhetőek legyenek. Lehetővé téve fehérjék emésztményekből való *bottom-up* azonosítását on-line tömegspektrométerrel kapcsolva (*peptide mass fingerprinting*: a fehérjék azonosítása a peptidek tömegei alapján, ismert fehérje szekvenciákon vagy akár a genom nukleotid sorrendjén alapuló adatbázisokkal korrelálva).

## 2. Felhasznált eszközök

A bioanalitikai mintaelőkészítés és analízis során a laboratóriumi készülékek széles skáláját használtam, az ultracentrifugától, centrifugális vákuum bepárló berendezésen, ultraszűrő eszközökön át, az automata preparatív kromatográfiás mikrokolonnáig (normál-, fordított-fázisú, méretkizárásos és affinitás állófázisokkal egyaránt), a tömegspektrometriától a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfián át, az egyedi és multikapilláris kivitelű kapilláris elektroforézisig. A kísérleti adatok feldolgozását, statisztikai értékelését és modellezési feladatokat magas szintű (programozható) szoftverekkel oldottam meg: MatLab, Pallas3.5.1.1, Mathematica7, PeakFit4.12.

### 3. A tudományos eredmények összefoglalása

Az elmúlt évek során a kapilláris elektroforézis területén elért eredményeim az alábbiak szerint foglalhatók össze.

#### 1. KOMPLEX SZÉNHIDRÁTOK NAGYHATÉKONYSÁGÚ ANALITIKAI VIZSGÁLATA.

- a. Analitikai minta-előkészítési módszert dolgoztam ki glikoproteinekből enzimatikusan (peptid-N-glikozidáz F enzimmel) felszabadított komplex szénhidrátok nagy áteresztőképességű multi-kapilláris gél elektroforézises vizsgálatára érzékeny LED-indukált fluoreszcenciás detektálással.
- b. A módszer érzékenységének növelésére kidolgoztam a reagálatlan jelölőanyag nagy feleslegének eltávolítására egy automatizálható normál fázisú kromatográfias mikropreparatív eljárást, melyet különböző méretkizárásos kromatográfias módszerekkel összehasonlítva értékeltem.
- c. A módszert ismert glikozilációjú fehérjék (ribonukleáz B, alfa-1-savanyú-glikoprotein, fetuin, immunglobulin G) vizsgálatával értékeltem. A nagy áteresztőképességű multi-kapilláris gél elektroforézis 12 minta gyors (5-10 perc analízisidő) párhuzamos analízisére (10 cm hosszúságú kapillárisokkal) nyújtott lehetőséget, vagy 4 párhuzamos elválasztásra 30 cm hosszú kapillárisokkal (15 perc analízisidővel) a felbontás további növelése mellett, kiváló érzékenységű detektálást (alacsony kimutatási határ) biztosítva.

#### 2. EXOGLIKOZIDÁZ ENZIMEMÉSZTÉSEN ALAPULÓ SZÉNHIDRÁT SZERKEZETVIZSGÁLAT ILLÉKONY PUFFER-RENDSZERREL.

- a. A komplex szénhidrátok szerkezetvizsgálatához az exoglikozidáz enzimekkel végzett emésztés módszerét dolgoztam ki a reakcióelegyben illékony puffer-összetevők alkalmazásával, mely a termékek érzékeny analízisét elektrokinetikus injektálással is biztosítja.
- b. A módszert az erősen szialilált glikán szerkezeteket (3 és 4 szialsavval – N-acetil-neuramin sav – rendelkező triantennáris komplex oligoszacharidokat) tartalmazó fetuin modell glikoprotein szialsavas csoportjainak neuraminidáz emésztéses felszabadításával sikeresen validáltam. A reakció-puffer ionos összetevőinek zavaró hatását (ionszupresszió az elektrokinetikus injektálás során) a minták analízisét megelőző centrifugális vákuumbepárlással szüntettem meg.

3. Komplex biológiai minták szabad szénhidrát tartalmának eltávolítása a mátrixhatások kiküszöbölésére.
  - a. A komplex biológiai minták (pl. vércsítmények) glikoprotein tartamának glikozilációinak analitikai vizsgálatát zavaró szabad redukáló szénhidrát tartalom (pl. vércukor) hatását sikerült megfelelő minta-előkészítéssel kiküszöbölnöm.
  - b. Igazoltam, hogy 3 és 10 kDa pórusméretű ultraszűrő eszközökkel a (glikoprotein) makromolekulák kiváló hatásfokkal visszanyerhetőek a vércukor hatékony eltávolítása mellett, különbséget a kisebb pórusméretű szűrőkkel fellépő nagyobb nyomásesés miatt a szűrési idő (centrifugális szűrés időtartama) növekedésében tapasztaltam.
4. BORONSAV - LEKTIN AFFINITÁS KROMATOGRÁFIÁS GLIKOPROTEIN IZOLÁLÁS ÉS DÚSÍTÁS
  - a. Megoldottam a glikoproteinek szelektív izolálására és dúsítására az m-aminofenil-boronsav és különböző lektinek keverékével végzett boronsav - lektin affinitás kromatográfia (BLAC) miniatürizálását és automatizálását.
  - b. Elvégeztem a BLAC mikropreparatív glikoaffinitás kromatográfia (búzacsíra agglutinin tartalmú BLAC/WGA állófázissal) hőmérsékleti optimalizálását automatizált programozható hőmérsékletű kialakítással.
  - c. Vizsgálataim rávilágítottak a boronsav tartalmú állófázisok és a (magas izoelektromos ponttal rendelkező) bázisos fehérjék (a tripszin inhibitor szennyezéseként jelen lévő lizozim) között, a glikoaffinitás kromatográfia során alkalmazott 8,7-es pH-n fellépő ioncserés retenciós mechanizmusra.
5. KOMPARATÍV HUMÁN SZÉRUM GLIKOZILÁCIÓS PROFIL VIZSGÁLAT BLAC GLIKOAFFINITÁS KROMATOGRÁFIÁS GLIKOPROTEIN DÚSÍTÁSSAL.
  - a. A komplex biológiai minták glikozilációjának vizsgálatára kidolgozott módszert sikerrel kombináltam az optimalizált BLAC glikoprotein dúsítással és alkalmaztam humán szérum glikozilációs profiljának vizsgálatára.
  - b. A BLAC/ConA (m-aminofenil-boronsav és konkanavalin A tartalmú állófázissal) technikával a humán szérum mintából kimutatható glikán csúcsok számát és intenzitását egyaránt hatékonyan sikerült növelnem.
  - c. Igazoltam a módszer alkalmasságát glikozilációs különbségek kimutatására kevert normál és prosztata karcinómás humán szérum mintákból.
6. KAPILLÁRIS ZÓNA ELEKTROFORÉZISES PEPTID ELVÁLASZTÁSOK MODELLEZÉSE.

- a. Peptidek kapilláris elektroforetikus mobilitásának modellezésére nagyhatékonyságú analitikai elválasztások tervezéséhez újszerű, paraméter vezérelt megközelítés alapján átfogó kísérleti adatbázist hoztam létre, nagyszámú elválasztási paraméter (az elválasztás hőmérséklete, a háttér elektrolit koncentrációja, szerves adalék – metanol és acetonitril – tartalma, alkalmazott feszültség, reprezentatív tripeptid minták tömege és töltése) kombináció mellett, a kísérleti elválasztások számának optimalizálásával. A kísérleti eredményeket statisztikailag értékeltem.
- b. A kétváltozós szemi-empirikus Offord-modellt és mesterséges neurális hálózati modelleket (egy momentum és adaptív tanulási arányú és egy Levenberg-Marquardt tanulási algoritmust használó) alkalmaztam a kísérleti adathalmazra. A modellek prediktív teljesítményét értékeltem a modellel számított és kísérletileg meghatározott peptid elektroforetikus mobilitás értékek korrelációja alapján.
- c. Az eredmények alapján megállapítottam, hogy mindössze két változóval (a minta molekulatömege és töltése) az elektroforetikus mobilitás nem határozható meg kellő pontossággal (az olyan elválasztás befolyásoló tényezőket, mint a hőmérséklet, a háttér elektrolit koncentrációja vagy szerves oldószer tartalma, a modell nem képes kezelni). Ugyanakkor a mesterséges neurális hálózati modellek minden fontos paramétert képesek inputként kezelni kiváló predikciós hatékonysággal ( $r^2=0,9972$ ). A mesterséges neurális hálózati modell lineáris modellezési technikákkal szemben mutatott kiváló teljesítménye alapján az elválasztás paraméterei és a peptidek elektroforetikus mobilitása között fennálló összefüggés nem-lineáris természetét (különösen az olyan komplex hatások, mint a hőmérséklet és szerves oldószertartalom együttes hatásai) is igazoltam.

## 4. Publikációk, előadások

### 4.1. Publikációk

1. Krisztián Horváth, **Marcell Olajos**, Attila Felinger, Péter Hajós: Retention controlling and peak shape simulation in anion chromatography using multiple equilibrium model and stochastic theory, *Journal of Chromatography A*, 2008, 1189, 42-51 **IF: 3,756**
2. **Marcell Olajos**, Péter Hajós, Günther K. Bonn, András Guttman: Sample preparation for the analysis of complex carbohydrates by multicapillary gel electrophoresis with light-emitting diode induced fluorescence detection, *Analytical Chemistry*, 2008, 80, 4241-4246 **IF: 5,287**
3. Stefan Mittermayr, **Marcell Olajos**, Tibor Chován, Günther K. Bonn, András Guttman: Mobility modeling of peptides in capillary electrophoresis (Review), *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27 (5), 407-417 **IF: 5,485**
4. **Marcell Olajos**, Alex Monzo, Lorenzo de Benedictis, Zuly Rivera, Günther K. Bonn, András Guttman: Boronic acid lectin affinity chromatography (BLAC) 2. Affinity micropartitioning-mediated comparative glycosylation profiling, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 392, 195-201 **IF: 3,328**
5. **Marcell Olajos**, Tibor Chován, Stefan Mittermayr, Tamás Kenesei, Péter Hajós, Imre Molnár, Ferenc Darvas, András Guttman: Artificial neural network modeling of pH dependent structural descriptor-mobility relationship for capillary zone electrophoresis of tripeptides, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2008, 31 (15), 2348-2362 **IF: 1,272**
6. **Marcell Olajos**, Ákos Szekrényes, Péter Hajós, Doug T. Gjerde, András Guttman: Boronic acid lectin affinity chromatography (BLAC) 3: Temperature dependence of glycoprotein isolation and enrichment, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 397(6), 2401-2407 **IF: 3,480**

### 4.2. Konferencia előadások

#### 4.2.1. Szóbeli előadások

1. **M. Olajos**, S. Mittermayr, A. Guttman: Model based approaches for the prediction of peptide mobilities in capillary zone electrophoresis; 5<sup>th</sup> International Symposium on Computer Applications and Chemometrics in Analytical Chemistry (SCAC2010), 21-25 June 2010, Budapest, Hungary

2. **M. Olajos**, S. Mittermayr, A. Guttman: Modell alapú megközelítések a peptidek kapilláris zóna elektroforézises elválasztásainak előrejelzésére; Műszaki Kémiai Napok 2010, 27-29 April 2010, Veszprém, Hungary
3. A. Guttman, **M. Olajos**, Á. Szekrényes, D. Gjerde: Glycosylation pattern analysis by glycoaffinity partitioning and multicapillary gel electrophoresis; MSB2009 24<sup>th</sup> International Symposium on MicroScale Bioseparations, 18-22 October 2009, Dalian, China
4. **M. Olajos**, S. Mittermayr, P. Hajós, A. Guttman: New Endeavors in Glycoproteome Analysis: High Throughput N-glycan Profiling by Capillary Gel Electrophoresis; 8<sup>th</sup> Balaton Symposium, 2009 September 2-4, Siófok, Hungary
5. S. Mittermayr, **M. Olajos**, T. Chován, A. Guttman: Application of Model-based Approaches to Predict Peptide Mobilities in CZE; 8th Balaton Symposium, 2-4 September 2009, Siófok, Hungary
6. **M. Olajos**, P. Hajós, G. K. Bonn, A. Guttman: Glikoprotein szacharidok molekuláris szerkezetének meghatározása multikapilláris elektroforézissel, LED indukált fluoreszcens detektálással; Műszaki Kémiai Napok 2009, 21-24 April 2009, Veszprém, Hungary
7. **M. Olajos**, A. Monzo, P. Hajós, A. Guttman: Temperature effects in boronic acid lectin affinity chromatography (BLAC); MSB2009 23<sup>rd</sup> International Symposium on MicroScale Bioseparations, 1-5 February 2009, Boston, USA
8. A. Guttman and **M. Olajos**: Sample preparation issues in complex carbohydrate analysis by capillary gel electrophoresis; CECE 2008 5th International Meeting on Bioanalysis, 24-25 November 2008, Brno, Czech Republic (Book of Abstracts page 19, ISBN 978-80-254-3194-8)
9. **M. Olajos**, P. Hajós, G. K. Bonn, A. Guttman: Glikoprotein szacharidok analízise komplex biológiai mintákból multikapilláris gél elektroforézissel; METT Vándorgyűlés 2008., 5-7 November 2008, Sárvár, Hungary
10. **M. Olajos**, S. Mittermayr, T. Chován, P. Hajós, A. Guttman: New advances in mobility modelling for capillary zone electrophoresis of peptides; 4<sup>th</sup> International Symposium on Computer Applications and Chemometrics in Analytical Chemistry (SCAC2008), 1-5 September 2008, Balatonalmádi, Hungary
11. A. Guttman, **M. Olajos**: Semi-automated sample preparation for capillary gel electrophoresis analysis of complex carbohydrates; 8<sup>th</sup> Horváth Award Symposium, Innsbruck, Austria, 14-15 April 2008
12. A. Guttman and **M. Olajos**: Sample preparation for capillary gel electrophoresis profiling of glycoprotein born N-linked oligosaccharides; MSB2008 22<sup>nd</sup> International Symposium on MicroScale Bioseparations, 9-13 March 2008, Berlin, Germany
13. A. Guttman, **M. Olajos**, H. Glasner, D. T. Gjerde, V. Amirkhani, M. Liu: High sensitivity profiling and sequencing of complex carbohydrates by multicapillary electrophoresis (oral presentation), CECE2007 4th International Meeting on Bioanalysis, 12-13 November 2007, Brno, Czech Republic
14. A. Guttman, Z. Rivera, **M. Olajos**, T. Ringer, R. Mayer, G. K. Bonn: Fluorescent Isotope Coded Affinity Tag (FCAT) for Quantitative Proteomics; Dalian2007, 25-28 October 2007, Dalian, China

15. T. Chován, S. Mittermayr, T. Kenesei, **M. Olajos**, I. Molnár, F. Darvas and A. Guttman: Artificial Neural Network Modeling of Structure-Mobility Relationships in CZE; 7<sup>th</sup> Balaton Symposium, 5-7 September 2007, Siófok, Hungary

#### 4.2.2. Poszterek

1. **M. Olajos**, P. Hajós, A. Guttman: New advances in glycoprotein analysis addressing structural investigation of complex glycans by capillary gel electrophoresis; Euroanalysis2009, 6-10 September 2009, Innsbruck, Austria
2. **M. Olajos**, K. Horváth, P. Hajós: Prediction of retention and elution profiles for analysis in high performance ion chromatography; Euroanalysis2009, 6-10 September 2009, Innsbruck, Austria
3. **M. Olajos**, S. Mittermayr, T. Chován, P. Hajós, A. Guttman: Capillary electrophoresis mobility modeling of peptides with particular emphasis on proteomics application; MSB2009 23<sup>rd</sup> International Symposium on MicroScale Bioseparations, 1-5 February 2009, Boston, USA
4. **M. Olajos**, A. Monzo, P. Hajós, A. Guttman: Temperature effects in boronic acid lectin affinity chromatography (BLAC); MSB2009 23<sup>rd</sup> International Symposium on MicroScale Bioseparations, 1-5 February 2009, Boston, USA
5. **M. Olajos**, Á. Szekrényes, P. Hajós, A. Guttman: Temperature effects in boronic acid – lectin affinity chromatography (BLAC) of proteins; CECE 2008 5th International Meeting on Bioanalysis, 24-25 November 2008, Brno, Czech Republic (Book of Abstracts page 31, 42, ISBN 978-80-254-3194-8)
6. K. Horváth, **M. Olajos**, P. Hajós: Többszörösen protonálható anionok ionkromatográfiás elválasztása; METT Vándorgyűlés 2008, 5-7 November 2008, Sárvár, Hungary
7. A. Monzo, **M. Olajos**, L. de Benedictis, G. Bonn, A. Guttman, Boronic Acid Lectin Affinity Chromatography (BLAC) In Glycoproteomics; HUPO 2008, #P-TUE-210, 18-20 August 2008, Amsterdam, Netherlands
8. A. Monzo, **M. Olajos**, L. de Benedictis, P. Hajós, G. K. Bonn, A. Guttman: Determination of disease specific glycosylation patterns in the human serum glycoproteome using boronic acid lectin affinity chromatography (BLAC) and multicapillary gel electrophoresis in different cancer types (poster), HPLC2008, Baltimore, USA, 10-16 May 2008
9. S. Mittermayr, **M. Olajos**, T. Chován, A. Guttman: Modeling of peptides structural descriptor – mobility relationship dependence on temperature and buffer organic solvent concentration in capillary zone electrophoresis using semi-empirical and artificial neural network approaches; HPLC2008, 10-16 May 2008, Baltimore, USA
10. **M. Olajos**, L. de Benedictis, P. Hajós, G. K. Bonn, A. Guttman: Analysis of complex carbohydrates by capillary gel electrophoresis with fluorescence detection; 8<sup>th</sup> Horváth Award Symposium, 14-15 April 2008, Innsbruck, Austria
11. L. de Benedictis, A. Monzo, **M. Olajos**, G. K. Bonn, A. Guttman: Comparative glycosylation profiling using boronic acid lectin affinity chromatography (BLAC) and capillary gel electrophoresis; 8<sup>th</sup> Horváth Award Symposium, 14-15 April 2008, Innsbruck, Austria

12. **M. Olajos**, A. Monzo, L. de Benedictis, P. Hajós, G. K. Bonn, A. Guttman: Analysis of human serum glycoproteins by boronic acid lectin affinity chromatography (BLAC) and multicapillary electrophoresis; APP 2008 5<sup>th</sup> International Meeting of the Austrian Proteomics Platform, 20-23 January 2008, Seefeld in Tirol, Austria
13. **M. Olajos.**, H. Glasner, L. de-Benedictis., D. Gjerde, V. Amirkhanian, M. Liu, G. Bonn, A. Guttman: Increased sensitivity analysis of complex carbohydrates by multicapillary electrophoresis; HPLC2007 conference, 17-21 June 2007, Ghent, Belgium
14. S. Mittermayr, **M. Olajos**, T. Kenesei, F. Darvas, I. Molnar, A. Guttman, T. Chován: Modeling of buffer pH dependent structure-mobility relationship in capillary zone electrophoresis using artificial neural networks (poster), HPLC2007 conference, 17-21 June 2007, Ghent, Belgium
15. K. Horváth, **M. Olajos**, A. Felinger, P. Hajós, Integrated Description of Chromatographic Process of Anions Using Stochastic Theory and Multiple Species Analyte/Eluent Retention Model; 19<sup>th</sup> Annual International Ion Chromatography Symposium, 24-27 September 2006, Pittsburgh, USA