



Tudományos Diákköri Dolgozat

# RÁCSCSATOLT INTERFEROMETRIA ENZIMATIKUS HASÍTÁS VALÓS-IDEJŰ KÖVETÉSÉRE

Készítette:

**Borbély Krisztina**

Egészségügyi mérnök MSc hallgató

**Belső konzulens:**

**Dr. Bonyár Attila**

Egyetemi docens, Elektronikai Technológia Tanszék  
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

**Külső konzulens:**

**Dr. Horváth Róbert**

Tudományos főmunkatárs, csoportvezető  
ELKH-EK MFA, Nanobioszenzorika Laboratórium

2022  
BUDAPEST

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>KIVONAT</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>RÖVIDÍTÉSEK</b> .....	<b>7</b>
<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	<b>8</b>
<b>2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	<b>9</b>
2.1 <i>Optikai bioszenzorok</i> .....	9
2.2 <i>A GCI bioszenzor felépítése</i> .....	10
2.3 <i>A GCI bioszenzor működési elve</i> .....	11
2.4 <i>Glikoproteinek</i> .....	12
2.5 <i>Glikoziláció</i> .....	14
2.6 <i>Fetuin glikoprotein</i> .....	14
2.7 <i>PNGáz F enzim</i> .....	15
<b>3. CÉLKITŰZÉS</b> .....	<b>17</b>
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	<b>18</b>
4.1 <i>Felhasznált anyagok</i> .....	18
4.2 <i>Mérési módszer</i> .....	18
4.2.1 <i>Kísérlet referencia-csatorna helyettesítésére</i> .....	18
4.3 <i>Mérések menete</i> .....	19
4.4 <i>Kondicionálás és stabilizáció</i> .....	19
<b>5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK</b> .....	<b>21</b>
5.1 <i>Immobilizáció</i> .....	21
5.2 <i>Kinetika</i> .....	22
5.3 <i>Az 1-es csatorna kísérleti adatainak kiértékelése</i> .....	24
5.4 <i>A 2-es csatorna kísérleti adatainak kiértékelése</i> .....	26
5.5 <i>A 3-as csatorna kísérleti adatainak kiértékelése</i> .....	27
<b>6. ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	<b>29</b>
<b>7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	<b>30</b>
<b>IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	<b>31</b>
<b>INTERNETES HIVATKOZÁSOK</b> .....	<b>33</b>

## KIVONAT

Az elmúlt években a jelölésmentes optikai bioszenzorok egyre szélesebb körben kerültek alkalmazásra az alap és alkalmazott kutatásokban és nagyban hozzájárultak számos biokémiai-, illetve biofizikai mechanizmus megértéséhez. Nagy előnyük, hogy még a rendkívül kis molekulatömegű hatóanyagok (100 Da alatti) molekuláris kötési folyamatainak a kinetikai elemzésére is lehetőséget biztosítanak. [1]

Méréseimet rácscsatolt interferometria (GCI, az angol Grating-Coupled Interferometry név rövidítése), egy hullámvezető interferometrián alapuló, nagyérzékenységű jelölésmentes optikai bioszenzor technika segítségével végeztem a WAVEdelta elnevezésű készüléken. A módszerrel molekuláris kölcsönhatások vizsgálatára, immobilizált ligandummal kölcsönhatásba lépő molekulák koncentrációjának, egyes kinetikai paramétereinek, illetve a kötőhelyek affinitási állandóinak meghatározására is lehetőség nyílik. A műszer rendkívüli érzékenysége abban is megmutatkozik, hogy segítségével akár a 100 Da alatti móltömegű molekulák mérése is lehetségessé válik. Működésének alapja egy kitágított lézernyaláb, mely egy kétcéllás folyadékkristály-modulátoron (LCM) keresztül világítja meg a GCI hullámvezető chipet. A megvilágító lézernyaláb mérő-, illetve referencia-nyalábokra van osztva, ezek pedig egy hullámvezető rétegbe vannak bevezetve optikai rácsok segítségével. A mérőnyaláb egy optikai ráccsal történő becsatolás után végighalad a hullámvezető rétegen. Miután a referencianyaláb is becsatolt, és a hullámvezetőben találkozik a mérőnyalábbal, a két nyaláb interferál egymással, és együttesen alakítják ki az interferencia jelet. Az eredő jel kicsatolódik egy 3. rácson keresztül a detektorba, ahol az eredő intenzitás és az interferencia jel mérhető. [1] [2] [3]

A mérési felület a GCI esetében a hullámvezető réteg azon része, ahol a mérőnyaláb végighalad, és ahol törésmutató-változás következik be az úgynevezett evanescens térben. Utóbbi a hullámvezető réteg felülete fölötti azon térrészt jelenti, ahol az elektromágneses hullám adott, a felülettől távolodva exponenciálisan lecsengő intenzitással jelen van. [2] [3]

A mérések során a PNGáz F (glikopeptidáz F) - mely az egyik legszélesebb körben alkalmazott és leghatékonyabb glikozidáz enzim glikoproteinek deglikozilálására - hasító hatását vizsgáltam a fetuin-A glikoprotein cukoregységeinek vonatkozásában. [i1] [i2]

A fetuin-A egy igen sokrétű funkcióval rendelkező glikoprotein, mely főként az embrionális sejtekben és hepatocitákban fejeződik ki. Kutatások azt támasztják alá, hogy számos kórkép patogenezisében is fontos szerepet játszik. [4]

A mérések fő célja annak vizsgálata volt, hogy mekkora mértékű változás figyelhető meg a fetuin szénhidrát egységeinek felületi tömegsűrűségben a PNGáz F enzim deglikoziláló hatására. A kiértékelés során megállapítottam, hogy a glikoprotein cukoregységeinek felületi tömegsűrűsége az 1-es csatornán  $-31,4 \text{ pg/mm}^2$ , a 2-es csatornán  $-19,3 \text{ pg/mm}^2$ , a 3-as csatornán pedig  $-6,8 \text{ pg/mm}^2$  értékre csökkent az 1. ciklus során, majd ciklusról-ciklusra egyre kisebb lett. A jelenség a GCI bioszenzorral valós időben kiválóan nyomon követhető.

## ABSTRACT

In the past decades, label-free optical biosensors have been increasingly employed in both basic and applied researches and have contributed significantly to the understanding of numerous biochemical and biophysical mechanisms. Their notable advantage is that they offer the possibility of kinetic analysis of even the affinity binding of low molar mass compounds (below 100 Da). [1]

My measurements were carried out using grating-coupled interferometry (GCI), a high-sensitivity, label-free optical biosensor technique based on waveguide interferometry, by employing a device called WAVEdelta. The method can be used to study molecular interactions, to determine the concentration of molecules interacting with surface immobilized ligands, key kinetic parameters of the interactions, and their affinity constants. The instrument's top sensitivity is also reflected in its ability to detect molecules as small as 100 Da in-molar weight. It works by using an expanded laser beam that illuminates the GCI chip through a two-cell liquid crystal modulator (LCM). The light beam from the laser source is split into a measurement beam and a reference beam, which are coupled into a waveguide layer by an optical grating. The measuring beam passes through the waveguide layer after being coupled in by an optical grating. After the reference beam is coupled and encounters the measuring beam, the two light beams interfere with each other and form the interference signal. The combined beam arrives at a detector through a third outcoupling grating, where the intensity and interference can be measured. [1] [2] [3]

The measurement surface for GCI is the part of the waveguide where the measurement beam passes through and where refractive index changes occur in the so-called evanescent optical field. The latter refers to the region of space above the surface of the waveguide layer where the electromagnetic wave is present with an exponentially decaying intensity away from the surface. [2] [3]

The measurements were performed to investigate the cleavage effect of PNGase F (glycopeptidase F), one of the most widely used and efficient glycosidase enzymes for glycoprotein deglycosylation, on the sugar units of fetuin-A glycoprotein. [i1] [i2]

Fetuin-A is a glycoprotein with a wide range of functions, expressed mainly in embryonic cells and hepatocytes. Research suggests that it plays an important role in the pathogenesis of many pathologies. [4]

The main aim of our measurements was to investigate the extent of change in the surface mass density of the carbohydrate units of fetuin due to the deglycosylation effect of PNGase F. In the evaluation I found that the surface mass density of the glycoprotein sugar units decreased to  $-31,4 \text{ pg/mm}^2$  in channel 1,  $-19,3 \text{ pg/mm}^2$  in channel 2 and  $-6,8 \text{ pg/mm}^2$  in channel 3 after the first cycle, and then decreased cycle by cycle. The small molecular scale effect could be followed by GCI in real-time.

## RÖVIDÍTÉSEK

DNS	deoxyribonucleic acid	dezoxiribonukleinsav
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride	1-etil-3(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid hidroklorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sodium dihydrogen phosphate	nátrium-dihidrogén-foszfát
NHS	N-hydroxysuccinimide	N-hidroxiszukcinimid
N	nitrogene	nitrogén
O	oxygen	oxigén
PBS	phosphate-buffered saline	foszfáttal pufferelt sóoldat
4-PCP	4-polycarboxylate polymer	4-poli-karboxilát polimer
RNS	ribonucleic acid	ribonukleinsav
SiO <sub>2</sub>	silicon dioxide	szilícium-dioxid
TaO <sub>5</sub>	tantalum pentoxide	tantál-pentoxid

# 1. BEVEZETÉS

A bioszenzorok tervezése és technológiai fejlesztése az elmúlt évtizedben exponenciális növekedésen ment keresztül és számos kutatás központi eleme lett. Mindez nem meglepő, és a bioszenzorok széleskörű alkalmazásainak köszönhető, mind az orvostudomány, mind a környezetvédelem, mind a biotechnológia területén. [5] [6]

A kutatómunkát az ELKH-Energiatudományi Kutatóközpont Nanobioszenzorika Laboratóriumában végeztem, melynek során különböző koncentrációkban alkalmazott PNGáz F szénhidráthasító enzim deglikoziláló hatását vizsgáltam a fetuin glikoproteinen, jelölésmentes optikai bioszenzor felhasználásával.

A GCI egy nagyérzékenységű, hullámvezető interferometrián alapuló technika, mely széleskörű kinetikai vizsgálatok elvégzésére ad lehetőséget. Működésének alapját egy kitágított lézernyaláb képezi, melynek sugara kettéválik mérő- és referenciasugárra. A hullámvezető felület egy nagy törésmutatójú TaO<sub>5</sub> -réteg, a mérési felület pedig a hullámvezető azon szakaszát jelöli, ahol a mérőnyaláb végighalad. A felületen megkötődő molekulák törésmutató-változást eredményeznek az evanescens térben, ahol az elektromágneses hullám a szenzorfelülettől távolodva exponenciálisan csökkenő intenzitással van jelen. [1] [2] [3] A GCI technika kifejlesztésében a Nanobioszenzorika Laboratórium központi szerepet játszott.

A WAVEdelta (Creoptix AG, Svájc) elnevezésű műszer részét több egység képezi: a WAVEcore, ami a mérő berendezés, a WAVEsampler, ami a minta adagoló rész, illetve egy vezérlő számítógép, ami WAVEcontrol program segítségével teszi lehetővé a valós idejű kísérlet-megfigyelést. A WAVEchip segítségével párhuzamosan több mérés bonyolítható le, emellett viszonyítási alapként funkcionáló referencia-csatorna alkalmazását is lehetővé teszi. A műszer rendkívüli érzékenysége bizonyos esetekben hátrány is lehet, hiszen még a legkisebb változásokat is észleli, melyek megnehezíthetik a kísérleti adatok pontos kiértékelését. [1] [2]

A fetuin glikoprotein elsősorban a vérben és az extracelluláris folyadékban található meg. Hordozó plazmafehérje, mely számos szervezetben végbemenő biokémiai folyamatban játszik szerepet. [4]

A PNGáz F enzim igen széleskörben alkalmazott glikozidáz, mely alkalmas a fehérjék és peptidek N-glikán egységeinek lehasítására. A kutatómunkám fő célja az enzim deglikozilációs képességét bebizonyítani a fetuin szénhidrát egységeivel kapcsolatosan, melynek felületi tömegsűrűségében csökkenést várok. [i1] [i2]



## 2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

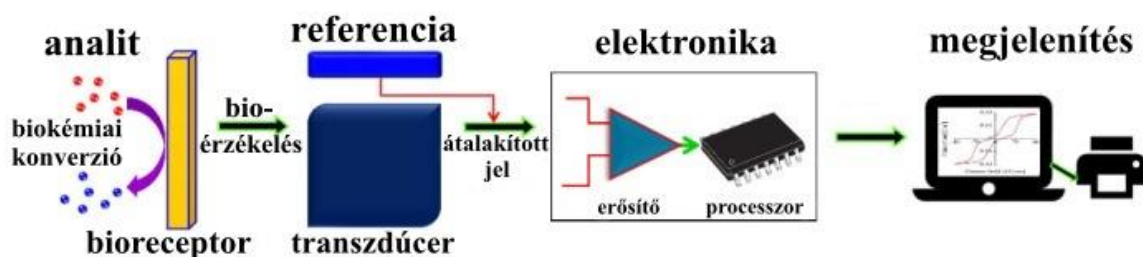
### 2.1 Optikai bioszenzorok

A bioszenzorok olyan érzékelők, melyek komplex mintában jelenlévő biomolekulák detektálására képesek. Mindezt úgy teszik, hogy az érzékelt fizikai vagy kémiai jelet optikai vagy elektromos jellé alakítják, ami végső soron az analit koncentrációjának meghatározásához használható fel. [6] [7]

A bioérzékelők többféle komponensből tevődnek össze. Van egy analit, amely definíció szerint azt az anyagot jelöli, mely összetevőinek azonosítása vagy kimutatása történik (például glükóz, ammónia vagy alkohol). A bioreceptor képes felismerni és kölcsönhatást kialakítani a célszubsztráttal (analittal). Funkciójuk szerint bioreceptor szerepet betölthetnek például enzimek, sejtek, nukleinsavak vagy antitestek. A jelátalakító, vagy másnéven transzdúcer a bioszenzorok kulcsfontosságú eleme, amely az analit-bioreceptor kölcsönhatások számával arányos optikai vagy elektromos jelet generál. A feldolgozás során az elektromos jelek erősítése és digitális formába történő alakítása zajlik, végső soron pedig a feldolgozott jeleket egy kijelző egység, általában számítógép számszerűsíti. [6] [7]

A jelátvitel módszere szerint beszélhetünk optikai, elektrokémiai, kalorimetrikus, piezoelektromos vagy mágneses bioszenzorokról. Az optikai bioszenzorok működése az optikai mező és a bioérzékelő elem kölcsönhatásának kihasználásán alapul, és jelöléses, valamint jelölésmentes detektálásra osztható. Utóbbi esetében a detektált jelet közvetlenül az elemzett anyag és a jelátalakító kölcsönhatása hozza létre. [5]

Az optikai bioszenzorok számos előnnyel bírnak a hagyományos analitikai technikákkal szemben, mivel lehetővé teszik a minták valós idejű és jelölésmentes detektálását. Nagyfokú specificitással és érzékenységgel rendelkeznek, emellett viszonylag kis méretűek és költséghatékonyak. [5]



1. ábra: Sematikus ábra a bioszenzorok működéséről Naresh, V., & Lee, N. cikke alapján [6]

## 2.2 A GCI bioszenzor felépítése

A GCI (grating-coupled interferometry) olyan hullámvezető interferometrián alapuló módszer, mely molekuláris kölcsönhatások megfigyelése mellett immobilizált ligandummal kölcsönhatásba lépő molekulák koncentrációjának, egyes kinetikai paramétereinek, és a kötőhelyek affinitási állandóinak meghatározására is lehetőséget ad. A műszer egy rendkívül nagy érzékenységgel rendelkező - már 100 Da alatti tömegű molekulák (vagy akár ionok) mérésére is lehetőséget biztosító - jelölésmentes optikai bioszenzor. [1] [2]

A WAVEdelta elnevezésű készülék több részből tevődik össze: a WAVEcore mérőegységből és a WAVEsampler mintafelvevő egységből – melyek a 2. ábrán figyelhetők meg -, illetve egy vezérlésre használt számítógép is a műszer részét képezi. Az úgynevezett WAVEchip – a 3. ábrán-, amely négy mikrofluidikai csatornával rendelkezik, mindig a mérőegység elején kerül behelyezésre. A négy mikrofluidikai csatornának köszönhetően egyszerre több mérés is lebonyolítható, illetve referencia-csatorna alkalmazása is lehetséges, mely viszonyítási alapként szolgálhat a kísérletek során. [1] [2]



2. ábra: A WAVEcore mérőegység és a WAVEsampler mintafelvevő-egység

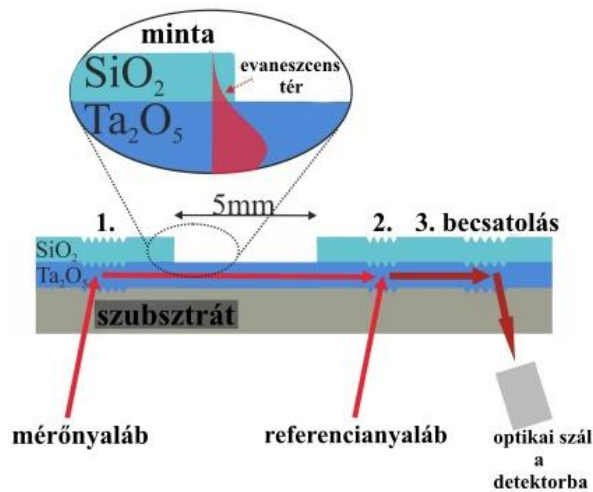


3. ábra: 4-poli-karboxilát polimer felülettel borított Creoptix WAVEchip (hullámvezető szenzor integrált mikrofluidikával). A képen jól látható a 4 db párhuzamos mérőcella.

### 2.3 A GCI bioszenzor működési elve

A szenzor működésének alapja egy eredetileg 0,8 mm széles, kitágított lézernyaláb, amely kétcellás folyadékkristály-modulátoron (Liquid Crystal Modulator, LCM) keresztül világítja meg a GCI chipet. A lézerforrás fénysugara ketté van osztva mérősugárra, illetve referenciasugárra, és ezek egy optikai hullámvezető TaO<sub>5</sub>-rétegbe vannak bevezetve. A hullámvezető felület – egy, a két becsatolási rács közötti 2-3 mm hosszú terület kivételével - vastag SiO<sub>2</sub> -réteggel van borítva. A két sugár tökéletesen párhuzamos, és ugyanazon a folyadékkristály modulátoron haladnak keresztül. A mérési felület a GCI esetében a hullámvezető azon szakaszát jelenti, ahol a mérősugár halad, és törésmutató-változás következik be az úgynevezett evaneszcens térben. Az evaneszcens tér a hullámvezető réteg felülete fölötti azon térrész, ahol az elektromágneses hullám adott, a felülettől távolodva exponenciálisan csökkenő intenzitással jelen van. A kialakult evaneszcens tér a már említett, két rács között elhelyezkedő, 2-3 mm hosszú területen lép kölcsönhatásba az általunk kiválasztott mintával. Amikor a mérősugár találkozik a referenciasugárral, a kettő interferál egymással, és együttesen hozzák létre az interferencia jelet. Az eredő jel kicsatolódik egy 3. rácson keresztül a detektorba, ahol az eredő intenzitás és az interferencia mérésére nyílik lehetőség. A mérőnyaláb fázisának változásával az interferencia karakterisztikája is

megváltozik. Az interferencia-karakterisztika nagy pontosságú méréséhez időben változó jelet szükséges előállítani, erre szolgál a már említett LCM. [2] [3]

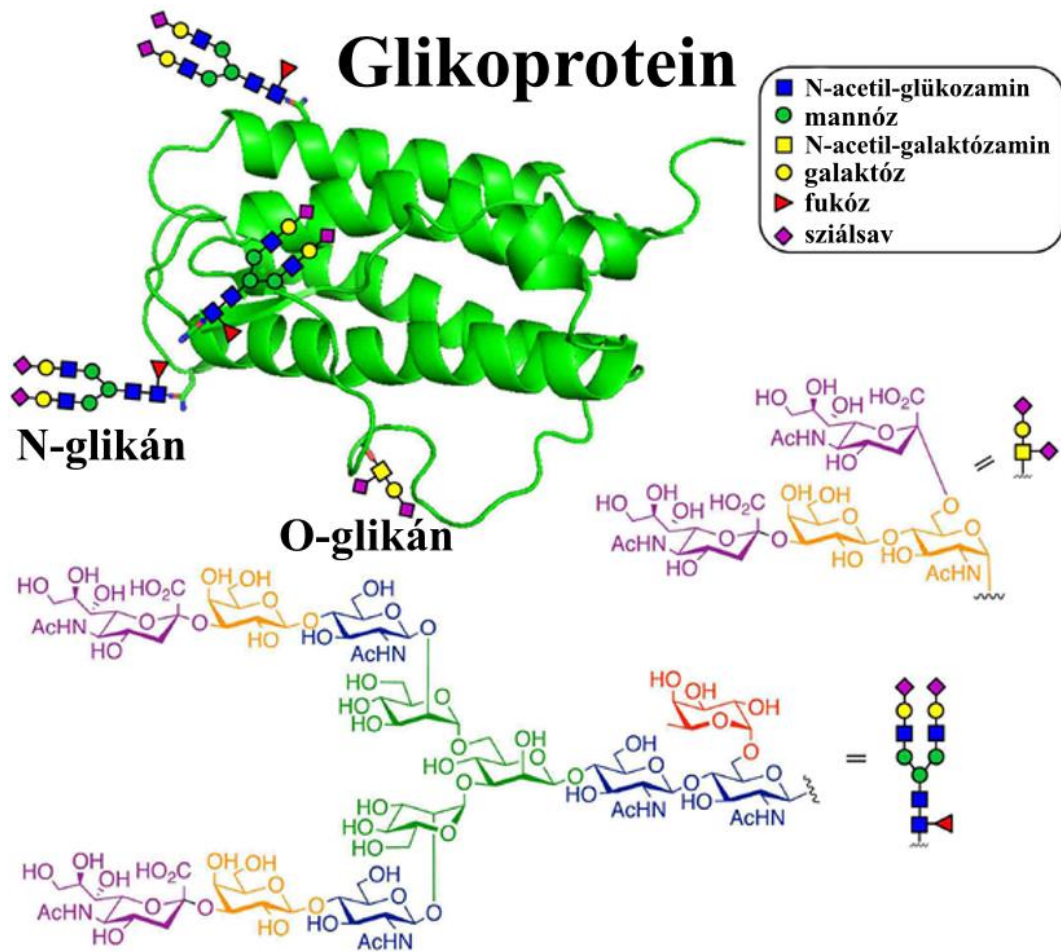


4. ábra: A GCI bioszenzor működése Patko, D és társai cikke alapján [3]

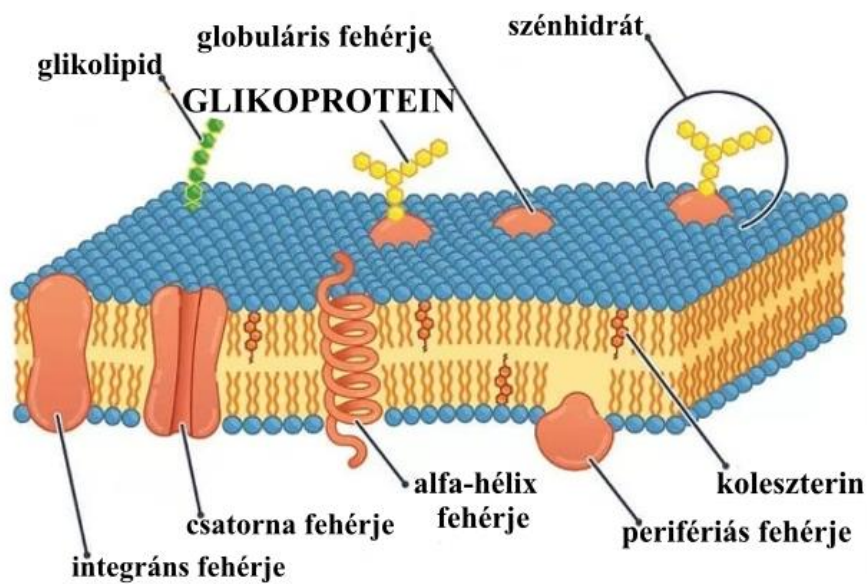
## 2.4 Glikoproteinek

A glikoproteinek olyan fehérjék, amelyek N- és O-glikozidos kötéssel rendelkező, összetett szerkezetű és funkciójú szénhidrátláncokat hordoznak. Szerkezetükre már nevükből is következtethetünk: fehérjéhez kötött cukorrészt foglalnak magukba. E két komponens kovalens kémiai kötéssel kapcsolódik egymáshoz, mely egy rendkívül stabil molekulát képez, és nem csak megakadályozza a peptidkötések proteolízis során történő lebomlását, hanem hőmérséklettel szemben is sokkalta ellenállóbbá teszi. [13] [8]

Oldott, membránhoz kötött és extracelluláris folyadék formájában szintúgy jelen vannak a sejtekben, azok felületén elhelyezkedve részben a sejtek egymáshoz tapadását szolgálják, részben pedig a sejt és környezete között meghatározott molekulák, ionok vándorlását, szállítását teszik lehetővé. Az élő szervezetben számos biokémiai folyamat szerves részét képezik. Funkciójuk szerint legtöbbször enzimek, transzfermolekulák, jelzőfehérjék vagy strukturális komponensek, de közreműködnek a hormonképzésben, a véralvadásban és az immunrendszer működésében is. [13] [9]



5. ábra: A glikoproteinek felépítése a N-glikán és O-glikán szénhidrátkomponensekkel Li, Y és társai cikke alapján [10]



6. ábra: Glikoproteinek és más membránalkotók a sejtmembránba ágyazva Sarah Knapp cikke alapján [i3]



## 2.5 Glikoziláció

A biológia centrális dogmája kimondja, hogy az élő szervezetekben az információ áramlása egyirányú, azaz DNS-ről RNS, majd fehérje képződik. A transzlációt, az intracelluláris fehérjeszintézist követően azonban további változások mennek még végbe, amelyek szükségesek ahhoz, hogy egy sejt, szövet és szervezet a későbbiekben majd el tudja látni biológiai funkcióját, aktivitását. Mindez a poszttranszlációs módosítások révén valósul meg, melyek a fehérjékben a szintézis után végbemenő, jellemzően enzimek által katalizált, kovalens kémiai módosításokat jelentik. [i4] [11]

A fehérje-glikoziláció az egyik leggyakrabban előforduló poszttranszlációs módosítás, mely egy szénhidrát-rész kovalens kapcsolódását jelenti egy aminosavhoz, ezáltal glikoproteint alkotva. A glikozilációs reakciók igen sokfélék, és különböző enzimek segítségével valósulnak meg, amelyek specifikus glikánokat, szénhidrát-komponenseket kötnek specifikus aminosavakhoz. [i4]

Az eukarióta fehérjék glikozilációját általában két fő típusba sorolják. Ezek közül egyik az N-kötésű, amikor a cukormolekula az aszparagin aminosav nitrogénjéhez kapcsolódik, míg másik az O-kötésű, amikor a cukormolekula a szerin vagy treonin aminosav oxigénatomjához kötődik. [i4]

A protein-glikoziláció a sejtek kulcsfontosságú fiziológiai és patológiai folyamatait szabályozza a szervezetben. Az aberráns, normálistól eltérő glikoziláció éppen ezért szorosan összefügg bizonyos betegségek kialakulásával. Mindez megmagyarázza, miért is releváns a glikoziláció jelenségével kapcsolatos kísérletek végzése. [12]

## 2.6 Fetuin glikoprotein

A fetuin vagy másnéven alfa-2-Heremans Schmid glikoprotein (AHSG) olyan heterodimer plazma-glikoprotein, amely egy 282 aminosavból álló A-láncot és egy 27 aminosav-maradványból álló, inter-diszulfidkötéssel összekapcsolt B-láncot tartalmaz. Elsősorban embrionális sejtekben, illetve hepatocitákban expresszálódik, és a vérben, valamint az extracelluláris folyadékban található meg. 1944-ben Kai Pedersen fedezte fel magzati borjúsérumban. [4] [13] [14]

Bár a fetuin-A poszttranszlációs módosításai nem teljesen tisztázottak és igen változóak lehetnek, számos vizsgálat azt támasztja alá, hogy a humán fetuin A és B polipeptidláncai

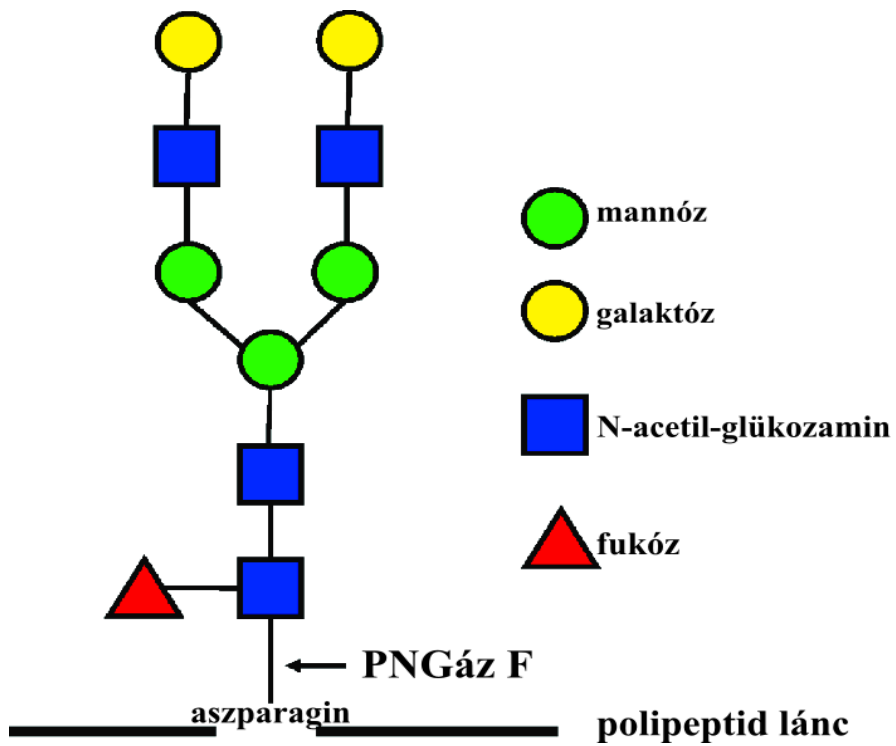
egyaránt glikoziláció, proteolitikus hasításon, foldingon és foszforiláción is keresztülmennek a biológiailag aktív glikoprotein szerkezet kialakulásáig. A natív fetuin-A módosítása általában N-glikozilációval indul a durva felszínű endoplazmatikus retikulumban, amelyet O-glikoziláció követ a Golgi-apparátusban. [4]

Számos kutatási eredmény arra enged következtetni, hogy a fetuin-A rendkívül multifunkcionális szerepkört betöltő fehérje. Olyan alapvető biológiai folyamatokban játszik kulcsfontosságú szerepet, mint például a csont- és kalcium-anyagcsere, vagy az inzulin-jelátvitel. A fetuin-A-ról azt is megállapították, hogy közreműködik különböző kórképek kialakulásában, mint például az inzulinrezisztencia (IR), a 2-es típusú diabetes mellitus (T2DM), a nem alkoholos zsírmájbetegség (NAFLD), egyes szív- és érrendszeri betegségek (CVD), bizonyos daganatos elváltozások és agyi rendellenességek. [4]

## 2.7 PNGáz F enzim

A PNGáz F (másnéven glikopeptidáz F vagy peptid-N4-(N-acetil-béta-glükózaminil) aszparagin amidáz) az egyik leghatékonyabb, illetve legszélesebb körben használt glikozidáz enzim a N-kötésű oligoszacharidok lehasítására, eltávolítására a glikoproteinekről és glikopeptidekről, melyek így proteomikai elemzés alá vethetők. A glikopeptidáz enzim a komplex oligoszacharidok N-acetil-glükózamin- és aszparagin-maradékai között hasít. [i1] [i2]

A PNGáz F-et gyakran használják annak meghatározására, hogy a fehérjék tartalmazznak-e glikozilált peptideket, és hogy a deglikoziláció befolyásolja-e a fehérje enzimaktivitását. Emellett előszeretettel alkalmazzák fehérjék és/vagy peptidek glikozilációs szintjének meghatározására, N-glikánok funkcionális szerepének elemzésére és fehérjék heterogenitásának csökkentésére. [i2]



7. ábra: PNGáz F enzim hasítása a glikoprotein N-acetilglükózamin és aszparagin része között Karav S., és társai cikke alapján [15]



### 3. CÉLKITŰZÉS

A kutatómunka során célul tűztem ki annak megfigyelését, hogy a fetuin glikoprotein PNGáz F glikozidáz enzimmel végzett hasítása során történik-e változás a glikoprotein szénhidrát egységeinek vonatkozásában, és ha igen, akkor mekkora mértékű a csökkenés a cukoregységek mennyiségében, melyről a kinetikai görbék kiértékelését követően a felületi tömegsűrűség szolgáltat információt. Tehát ha sikeres a glikoprotein deglikozilálása, a szénhidrát-komponensek lehasítása, abban az esetben a felületi tömegsűrűség kapcsán csökkenés figyelhető meg.

A méréseket - melyek egy 4-PCP-felülettel borított WAVEchip segítségével valósulnak meg - a WAVEdelta jelölésmentes optikai bioszenzoron, a WAVEcontrol nevű programban tudjuk valós időben nyomon követni és még a legkisebb változásokat is észlelni.

A kondicionálási és a stabilizációs műveletet követően a fetuin glikoprotein a WAVEchip 1-es, 2-es, és 3-as csatornáján kerül immobilizálásra, a 4-es csatorna pedig referencia-csatornaként funkcionál a mérések során.

A kinetikai széria keretében a PNGáz F glikozidáz enzimet a chip mind a négy csatornáján injektáljuk. Az enzim hatás révén bekövetkező változásokat valós időben figyeljük a számítógépes programban.

Végző soron a kapott eredmények a referencia-csatornával korrigálva kerülnek kiértékelésre.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1 Felhasznált anyagok

- foszfátpuffer (PBS tableta, pH= 7,4, Sigma-Aldrich)
- borát puffer, pH=9 (Xantec Bioanalytics)
- EDC (Xantec Bioanalytics)
- NHS (Xantec Bioanalytics)
- etanolamin, pH=8 (Sigma-Aldrich)
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Spektrum 3D)
- Milli-Q víz (ultratiszta víz, 18,2 MΩ·cm ellenállású 25°C-on)
- PNGáz F enzim (Pannon Egyetem)
- fetuin (fetális szállító fehérje, Pannon Egyetem)

### 4.2 Mérési módszer

A mérések egy négycsatornás, PCP-felületű WAVEchip segítségével valósulnak meg, melynek sematikus ábrája a 8. ábrán figyelhető meg. Erre történik meg a fetuin glikoprotein ligandum immobilizálása, kovalens kikötése. A chip csatornáin a mérések során folyamatos az oldat-áramoltatás.

**PCP**



8. ábra: Poli-karboxilát polimer felületű Creoptix WAVEchip sematikus ábrája [i5]

#### 4.2.1 Kísérlet referencia-csatorna helyettesítésére

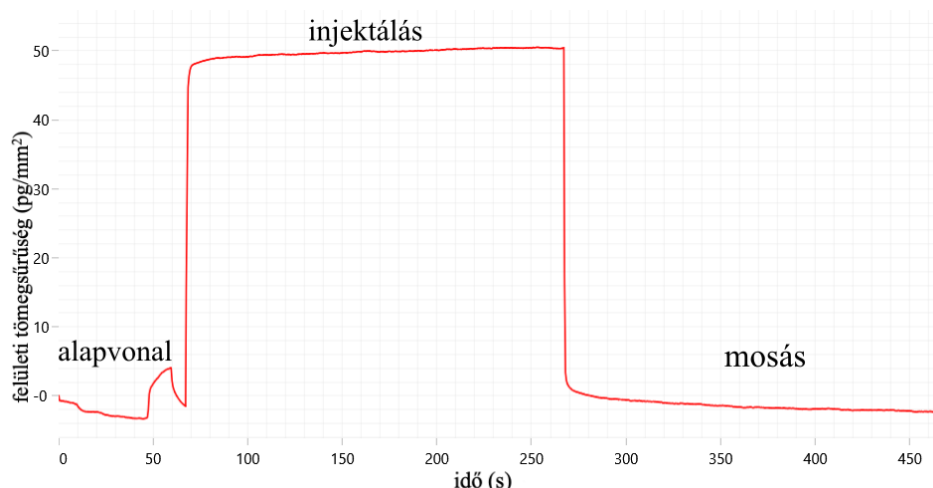
Mérésünk során egy többszörösen emésztett csatorna, illetve egy 2 M-os koncentrációjú guanidin-kloridos denaturáción átesett csatorna referencia-csatornaként történő alkalmazásával is próbálkoztunk. Ezek közül egyik esetben sem tapasztaltunk számottevő változást a sima referencia-csatornához viszonyítva.

### 4.3 Mérések menete

A glikozidáz enzim hasítást több mérés keretében is vizsgáltuk. Dolgozatomban ezek közül most egy mérést mutatok be a kondicionálási művelettől kezdődően a kiértékelés során kapott eredményekig. A mérés során a különböző csatornákon különböző hígításban alkalmaztuk az enzimet és figyeltük meg deglikozilációs hatását.

A PNGáz glikozidáz enzim-oldatot a Pannon Egyetemről kaptuk, melynek fehérje-koncentrációja 0,12 mg/ml volt. Méréseink során ezzel, illetve ennek hígításaival dolgoztunk.

Egy GCI ciklus több lépésből áll, ezek az alábbi ábrán figyelhetők meg. Az alapvonal beállítását követően injektálás zajlik, ez az asszociációs lépést foglalja magába. A mosás pedig a disszociációs lépést jelenti.



9. ábra: Egy GCI ciklus szakaszai: az alapvonal beállítása, injektálási lépés, majd a mosási lépés

### 4.4 Kondicionálás és stabilizáció

Egy mérés minden esetben több részre osztható, ezek az úgynevezett szériák, melyek tovább oszthatók kisebb ciklusokra. Az első ilyen széria a mérések során az úgynevezett kondicionálás volt.

A kísérlet elején új 4-PCP-chip került behelyezésre a WAVEcore mérőegységbe. Ennek okán még az immobilizációs széria előtt elengedhetetlen művelet a kondicionálás, mely a chip felületét tökéletesíti, készíti elő az immobilizációra, és biztosítja, hogy a lehető legnagyobb mennyiségű ligandum tudjon majd odakötődni az immobilizáció keretében. A kondicionálási

művelet során 50 mM-os koncentrációjú, pH 9-es borátpuffer-oldat injektálása zajlik a chip csatornáin.

A kondicionálást stabilizációs művelet követi, mely a méréshez használt puffer, tehát PBS-oldat áramoltatását jelenti az alapvonal beállításának céljából. A stabilizációs szériát úgynevezett 'startupok' alkotják.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

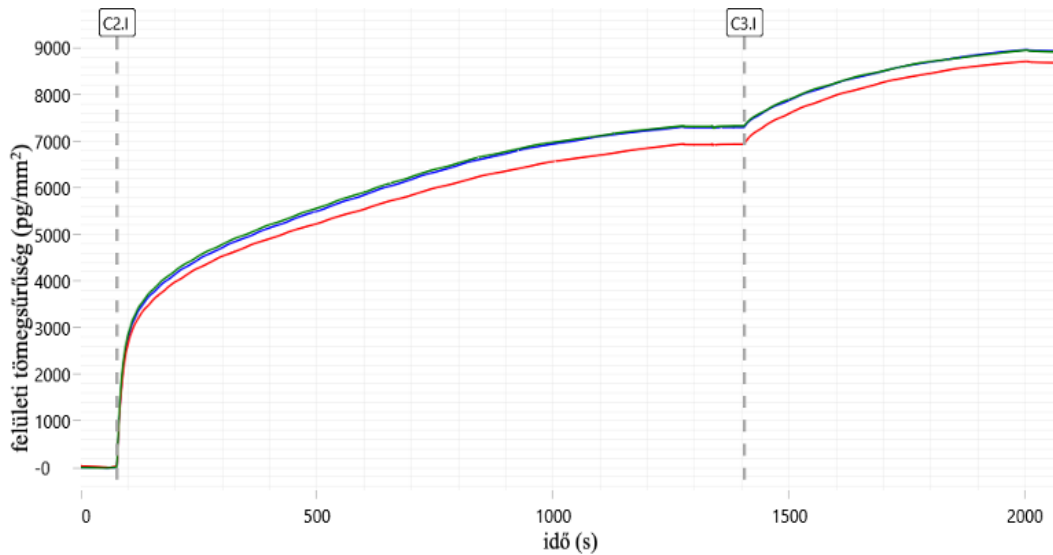
### 5.1 Immobilizáció

Fehérje-ligandumok esetében a legáltalánosabban használt immobilizációs módszer az úgynevezett aminkapcsolás, mely egy kovalens kémiai kapcsolás. Ennek során az immobilizáció a szabad primer amino-csoportokon keresztül történik, mint például a lizin-maradványok, vagy a fehérjék és peptidek gyakori komponense, úgynevezett N-terminálisa. A PCP WAVEchip vastag polikarboxilát-alapú, hidrogél bevonata szabad karboxil-csoportokat hordoz, amelyhez a fehérjéket EDC/NHS kötéskémia segítségével, az előbb említett módon kovalensen lehet kötni. [1] [16]

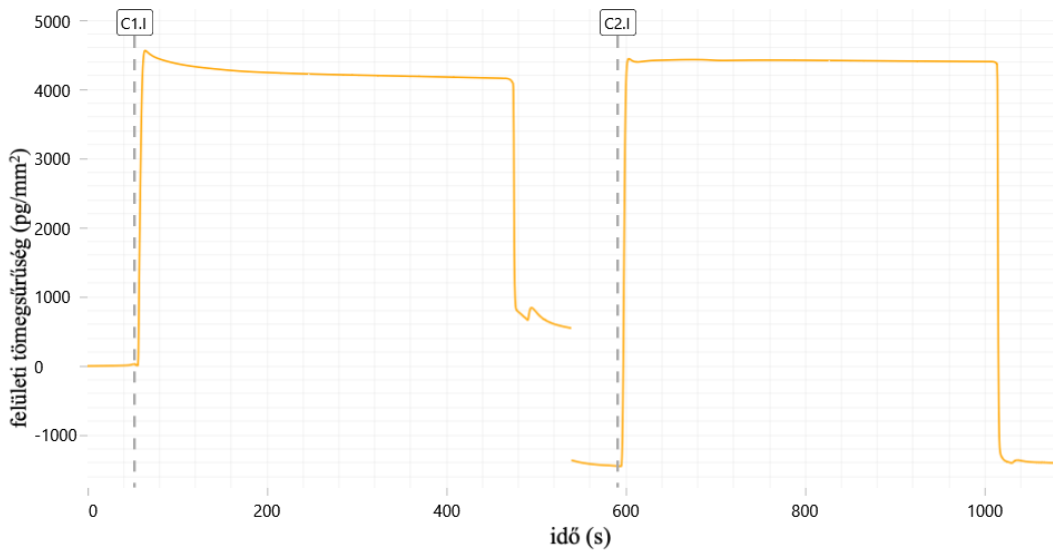
Az immobilizációs széria során a fetuin glikoproteint a 4-PCP chip 1-es, 2-es, és 3-as csatornáján immobilizáltuk, az előbbieken említett módon kovalensen kötöttük EDC/NHS reagens és 1 M-os etanolamin segítségével a chip felületre. Az immobilizációhoz 50 mM-os koncentrációjú  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  -oldatot alkalmaztunk pufferként. Immobilizáció során két ciklusban 500 ug/ml-nyi fetuint áramoltattunk a chip 1-es, 2-es és 3-as csatornáján 1200 s és 600 s időtartamokban.

A 10. ábrán jól megfigyelhető, hogy az 1-es csatornán  $\sim 8900 \text{ pg/mm}^2$ , a 2-es csatornán  $\sim 8800 \text{ pg/mm}^2$ , a 3-as csatornán pedig szintén  $\sim 8900 \text{ pg/mm}^2$  felületi tömegsűrűségű fetuin kötődött kovalensen a chipfelületre a kísérlet immobilizációs művelete során.

A 4-es csatorna a mérések során referencia-csatornaként került alkalmazásra, ezen csak aktiválás és passziválás ment végbe, immobilizáció nem. Az aktiváció során aktívvá tettük a chip felületét, hogy minél nagyobb mennyiségű fetuin protein tudjon kovalensen odakötődni. A passziválás keretében pedig a szabadon maradt kötőhelyeket zártuk le, hogy további kötődés a felületre már ne tudjon megvalósulni.



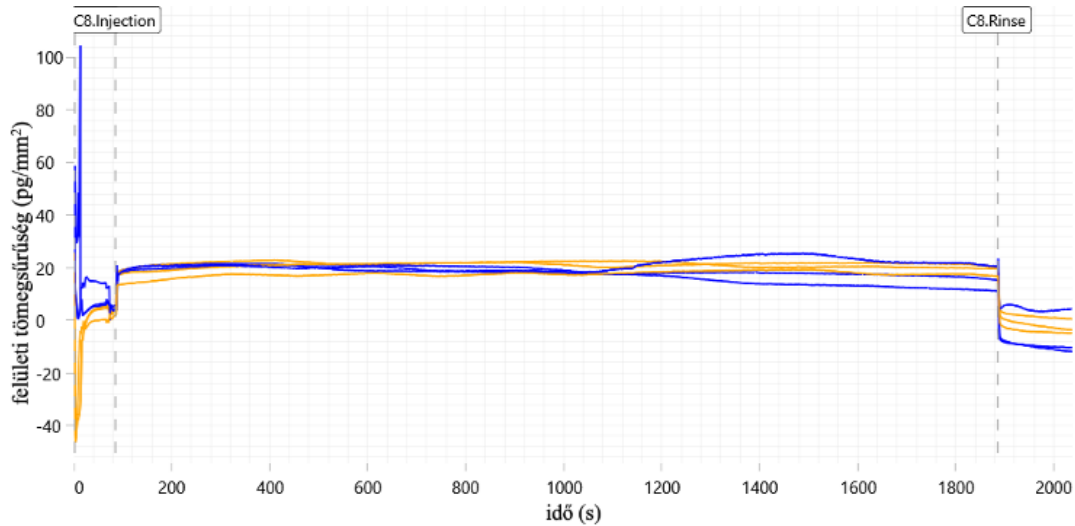
10. ábra: A fetuin immobilizációs görbéje a felületi tömegsűrűség és az idő függvényében feltüntetve (1-es csatorna kék, 2-es piros, 3-as zöld színnel szerepel)



11. ábra: A referencia-csatorna elkészítése az aktiválással és a passziválással

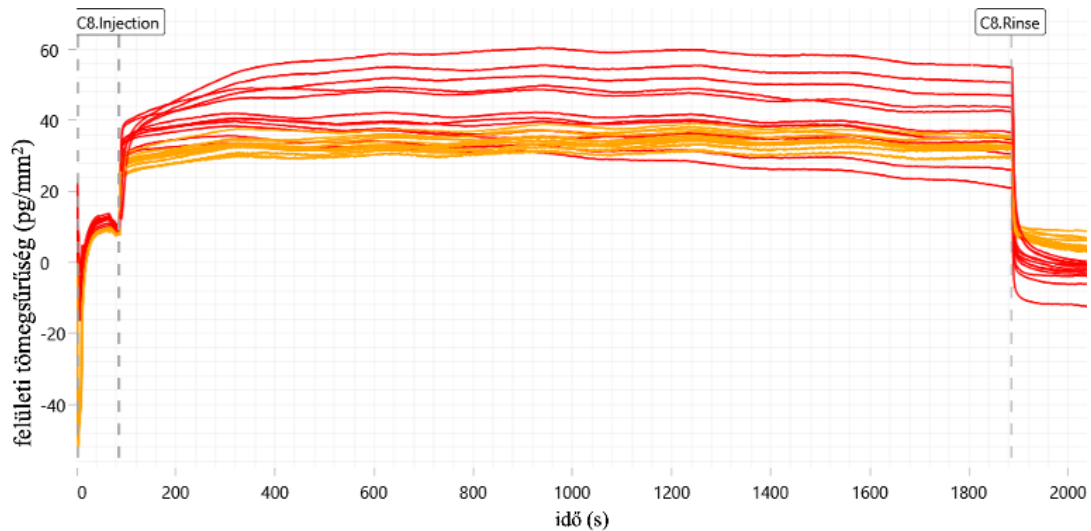
## 5.2 Kinetika

Az 1-es csatornán 1-szeres PBS-oldatot alkalmaztunk pufferként és PNGáz F enzim 50-szeres hígítással készített oldatát használtuk. Utóbbit 15 ciklus során áramoltattuk az 1-es csatornán. Az asszociációs idő 1800 s volt, míg a disszociációs idő pedig 150 s. Az asszociáció az injektálást, a disszociáció pedig mosási lépést foglal magába. Sajnos a mérés során előfordult, hogy egyes ciklusok során levegőbuborék került injektálásra a felületre, ezen ciklusokat a kiértékelés során figyelmen kívül kellett hagynunk.



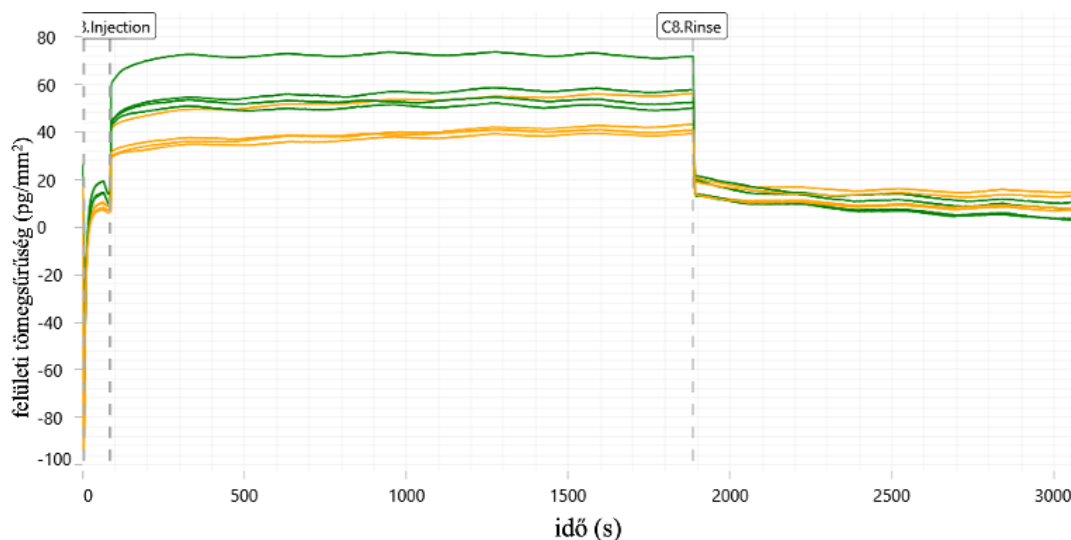
12. ábra: Az 1-es és a 4-es csatorna az enzimátikus hasítás után a felületi tömegsűrűség és az idő függvényében ábrázolva (az 1-es csatorna kékekkel, a 4-es csatorna sárga színnel szerepel)

A 2-es csatornán 1-szeres töménységű PBS-oldatot alkalmaztunk, mint puffer és az enzim 20-szorosára hígított koncentrációját áramoltattuk a chip 2-es és 4-es csatornáján. Az asszociációs idő ezen csatorna esetében is 1800 s, a disszociációs idő pedig 150 s volt. A 4-es csatorna ebben az esetben is referencia-csatorna szerepet töltött be, tehát kizárólagosan aktiválás és passziválás történt rajta, immobilizációt nem végeztünk.



13. ábra: A 2-es és a 4-es csatorna az enzimátikus hasítás után a felületi tömegsűrűség és az idő függvényében ábrázolva (a 2-es csatorna pirossal, a 4-es csatorna sárga színnel szerepel)

A 3-as csatorna esetében az enzim tömény oldatát alkalmaztuk, és szintén 1-szeres PBS-oldat volt a pufferünk. Az enzim 5 ciklusban lett injektálva a 3-as és 4-es csatornára. Az asszociációs idő 1800 s-ra, a disszociációs 1200 s-ra lett beállítva.



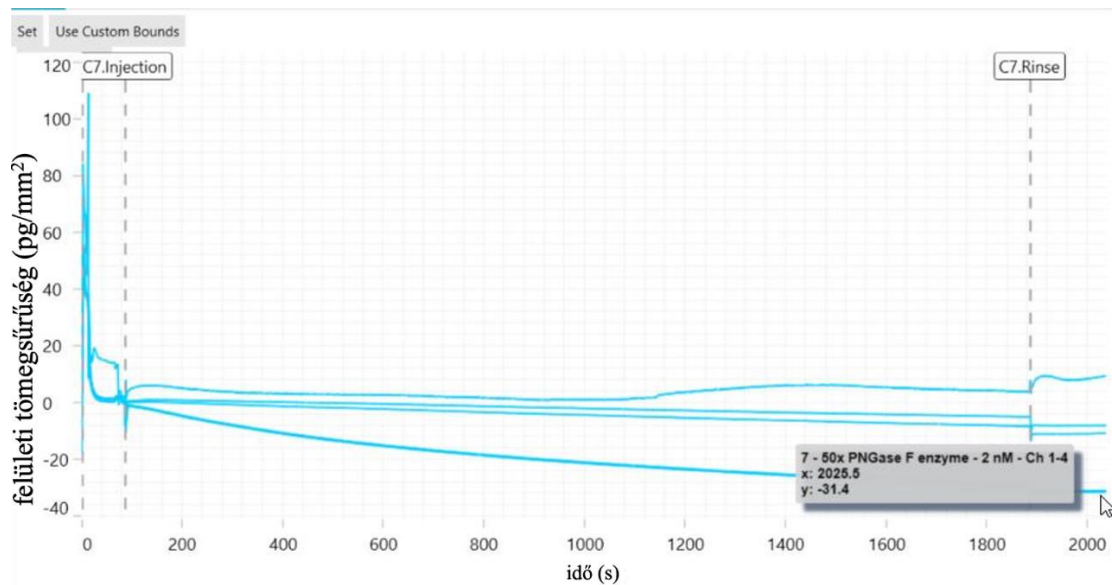
14. ábra: A 3-as és a 4-es csatorna az enzimátikus hasítás után a felületi tömegsűrűség és az idő függvényében ábrázolva (a 3-es csatorna zölddel, a 4-es csatorna sárga színnel szerepel)

### 5.3 Az 1-es csatorna kísérleti adatainak kiértékelése

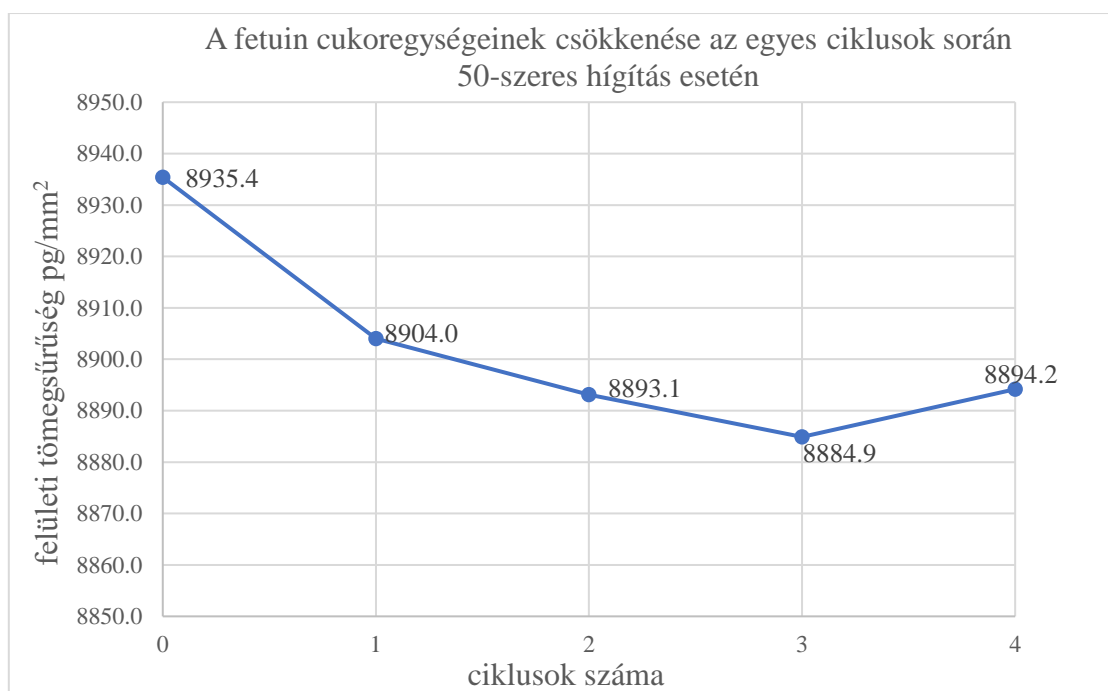
A kísérletek során kapott görbéket a referencia-csatornával korrigáltuk mind a három csatorna esetében. A mérések során úgynevezett „blankeket”, vakpróbákat is alkalmaztunk, melyek az apróbb eltérések, torzítások kiküszöbölését szolgálják. Definíciójuk szerint a minta áramoltatásával közel azonos, de analit nélküli injektálások. Ebből triviális módon következik, hogy a vakpróbát pontosan ugyanazzal a pufferrel kell végezni, mint ami az analit készítése során került felhasználásra. Minden harmadik-ötödik mintainjektálás után szükséges egy vakpróbát is végezni. A blanke kivonásra kerülnek a minta injektálási ciklusaiból, ez az úgynevezett kettős referencia alkalmazása, mely az eltérések eliminálásnak rendkívül hatékony módszere. [16]

Az 1-es csatorna kísérleti adatainak WAVEcontrol program segítségével végzett kiértékelése során megállapítottuk, hogy a felületen immobilizált fetuin glikoprotein cukoregységeinek mennyisége  $-31,4 \text{ pg/mm}^2$ -re csökkent az 1. ciklus során, majd ciklusról-ciklusra további redukción mutatott. A 15. ábrán mindez jól megfigyelhető, és arra enged következtetni, hogy a PNGáz F enzimmel végzett enzimátikus hasítás eredményesnek tekinthető.





15. ábra: Az 1-es csatorna az enzimatis hasítás után a referencia-csatornával korrigálva, a felületi tömegsűrűség és az idő függvényében ábrázolva



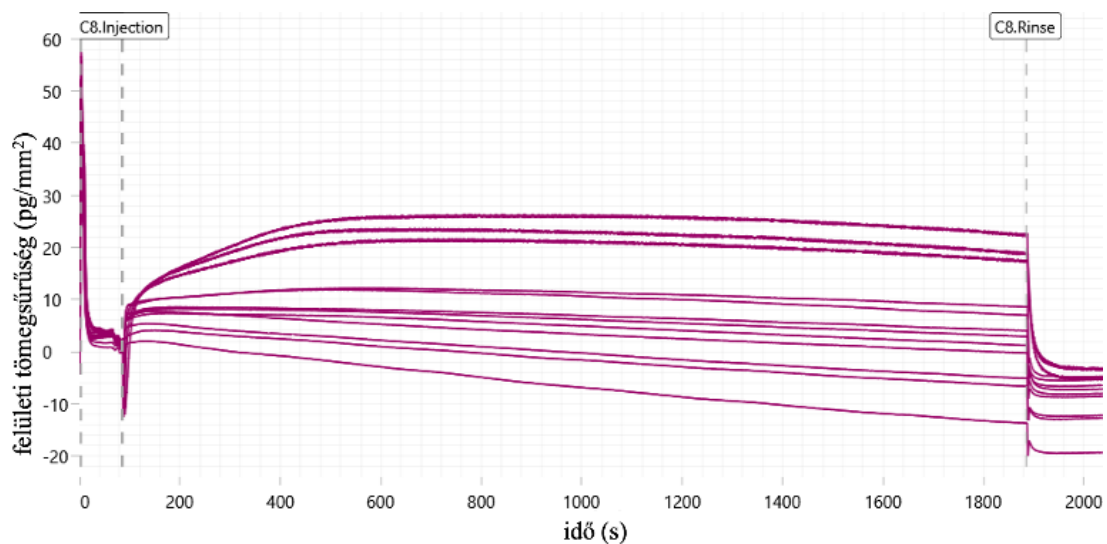
16. ábra: Diagram a fetuin cukoregységeinek ciklusról-ciklusra történő csökkenéséről, a felületi tömegsűrűség és a ciklusok számának függvényében ábrázolva

A 16. ábrán jól látható, hogy az 1-es csatornán a glikoprotein szénhidrát egységeinek felületi tömegsűrűsége az egymást követő ciklusok során egyre csökkenő tendenciát mutatott.

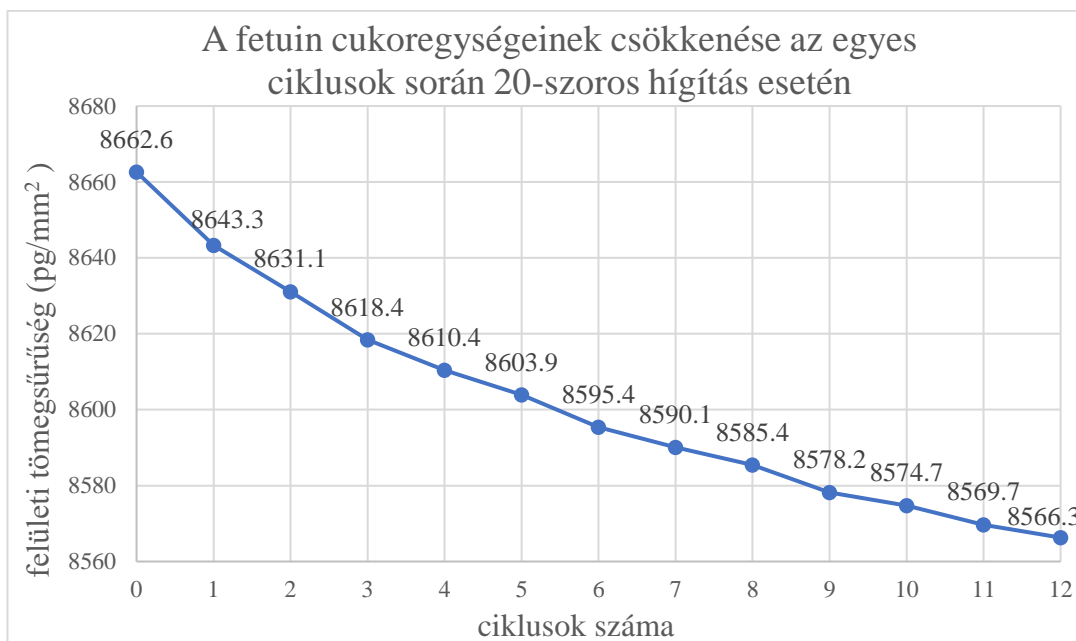
Az utolsó ciklus végén a glikozidáz enzim hatására a felületi tömegsűrűség  $8894,2 \text{ pg/mm}^2$  értékű lett.

#### 5.4 A 2-es csatorna kísérleti adatainak kiértékelése

A 2-es csatorna esetében a referencia-csatornával korrigált görbék alapján megállapítható, hogy a felületre kovalensen kötött fehérje szénhidrátunitjainak mennyisége  $-19,3 \text{ pg/mm}^2$ -re csökkent (17. ábra) az 1. ciklus során, majd ezt követően ciklusról-ciklusra egyre kisebb volt a felületi tömegsűrűségben észlelhető csökkenés. Ez a felületi tömegsűrűségben tapasztalható redukció szintúgy a PNGáz F glikozidáz enzim eredményes hasító hatását támasztja alá.



17. ábra: Az 2-es csatorna az enzimátikus hasítás után a 4-es, referencia-csatornával korrigálva, a felületi tömegsűrűség és az idő függvényében ábrázolva

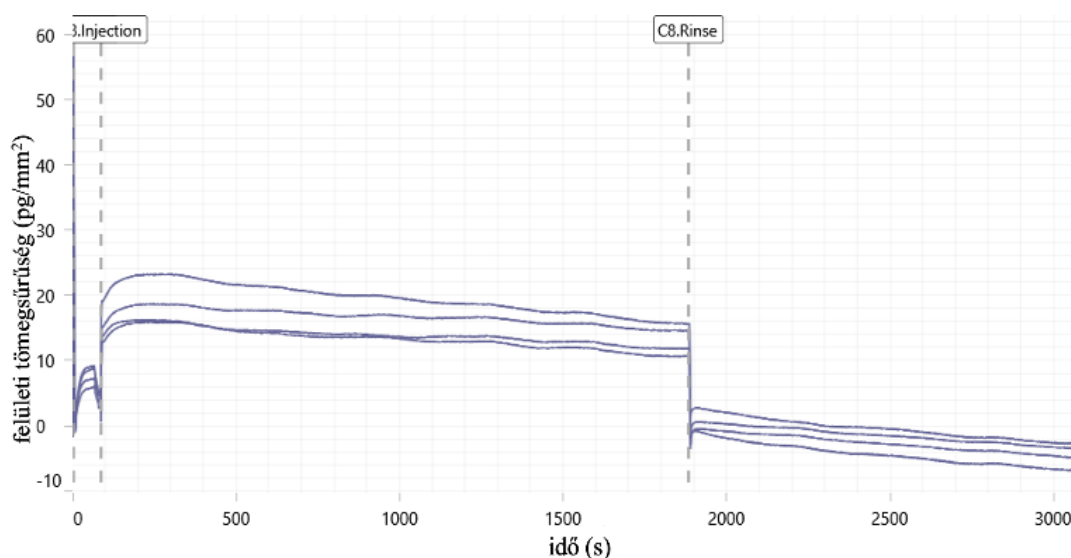


18. ábra: Diagram a fetuin cukoregységeinek ciklusról-ciklusra történő csökkenéséről, a felületi tömegsűrűség és a ciklusok számának függvényében ábrázolva

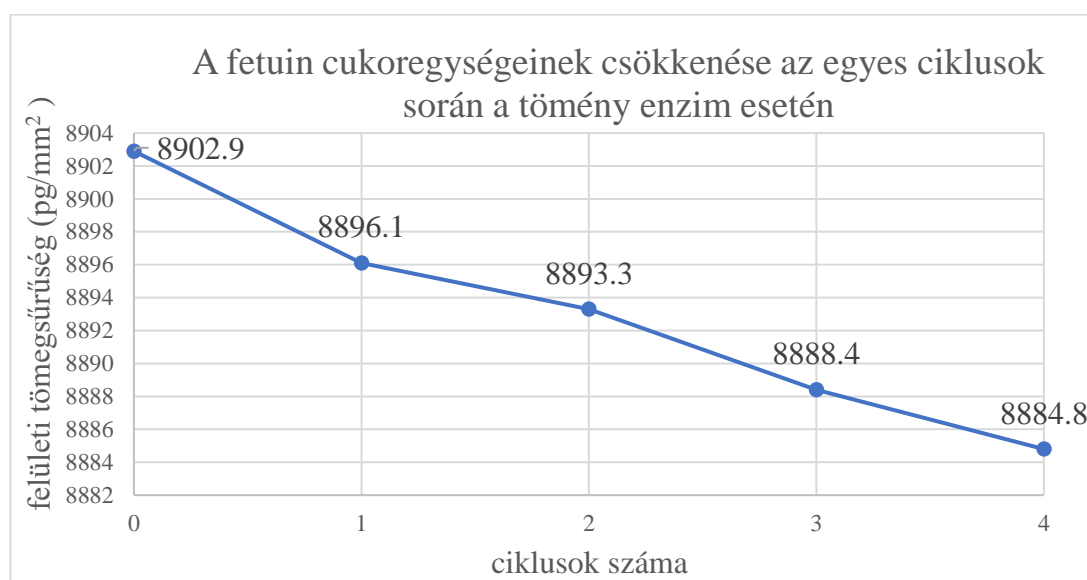
A 2-es csatornán minden ciklus után egyre kevesebb lett a glikoprotein cukorunitjainak felületi borítottsága, ami a 18. ábrán jól látható. Ebben az esetben kevesebb ciklus során merült fel hiba a levegő buborékok miatt, így a kapott eredmények alapján jobban megfigyelhető a felületi tömegsűrűség csökkenése. Az utolsó ciklus végére a borítottság 8566,3 pg/mm<sup>2</sup>-re csökkent.

### 5.5 A 3-as csatorna kísérleti adatainak kiértékelése

A 3-as csatornán végzett hasítás kiértékelése során, a kapott eredmények referencia-csatornával végzett korrigálása során azt állapítottuk meg, hogy a fetuin glikoprotein cukoregységeinek felületi tömegsűrűsége -6,8 pg/mm<sup>2</sup> értékre redukálódott az 1. ciklus során, és ciklusról-ciklusra egyre kisebb lett ez az érték. Mindez arra enged következtetni, hogy glikozidáz F enzim ebben az esetben is hatékonynak bizonyult. A kapott értékek az alábbi, 19. ábrán figyelhetőek meg.



19. ábra: A 3-as csatorna az enzimátikus hasítás után a referencia-csatornával korrigálva, a felületi tömegsűrűség és az idő függvényében ábrázolva



20. ábra: Diagram a fetuin cukoregységeinek ciklusról-ciklusra történő csökkenéséről, a felületi tömegsűrűség és a ciklusok számának függvényében ábrázolva

A 20. ábrán figyelhető meg mérésünk során a 3-as csatornán bekövetkező, ciklusonkénti szénhidrátunit felületi tömegsűrűségének csökkenő tendenciája. Az utolsó ciklus végére a felületi borítottság  $8884,8 \text{ pg/mm}^2$  értékre redukálódott a PNGáz F enzim hasítása révén.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatómunka során a PNGáz F glikozidáz enzim hatását vizsgáltam a fetuin-A glikoprotein vonatkozásában, valós-időben nyomon követve és a GCI jelölésmentes optikai bioszenzor segítségével.

A fetuin főként embrionális sejtekben és hepatocitákban expresszálódó, a szervezetben multifunkcionális szerepkört betöltő fehérje. A protein-glikozilációnak a fiziológiás, illetve a patológiás élettani folyamatokban egyaránt kulcsfontosságú szerep tulajdonítható, ennek okán az ezzel kapcsolatos, proteomikai kísérletek végzése igencsak releváns. [4]

A méréseket különböző hígítású enzim-koncentrációkkal végeztük el, Creoptix WAVEchip felhasználásával. A chip PCP felületéhez kovalens kémiai kötőerőkkel, EDC/NHS reagenssel, az úgynevezett aminkapcsolással immobilizáltuk a fetuint az 1-es, 2-es és a 3-as csatornákon. A 4-es csatorna referencia-csatornaként funkcionált, ezen immobilizáció nem történt, csak aktiválást és passziválást végeztünk. [16]

A kinetikai szériában injektáltuk a PNGáz F enzimet a csatornákon, és valós-időben figyeltük meg, milyen hatást gyakorol a fetuin glikoprotein cukoregységeinek felületi tömegsűrűségére.

A referencia csatornával való korrigálás során megállapítottuk, hogy az 1-es csatornán  $-31,4 \text{ pg/mm}^2$ , míg 2-es csatornán  $-19,3 \text{ pg/mm}^2$ , a 3-as csatornán pedig  $-6,8 \text{ pg/mm}^2$  értékre csökkent a fetuin cukorunitjainak tömegsűrűsége az 1. ciklust követően, majd a felületi borítottság ciklusról-ciklusra egyre csökkenő tendenciát mutatott.

A kísérleti adatok referencia-csatornával való kiértékelése során kapott eredmények az enzim hatékony deglikozilációs képességét támasztják alá, melyet az 1-es, 2-es, és 3-as csatornákon kovalens kémiai kötéssel immobilizált fetuin cukoregységeinek redukált felületi borítottsága bizonyít. Ez arra enged következtetni, hogy a műszer kiválóan alkalmazható e típusú kísérletek elvégzésére, annak okán, hogy még a deglikoziláció révén bekövetkező apró változásokat is detektálni tudja. Ki lehet jelenteni, hogy a GCI technika kinetikai paraméterek, kötőhely affinitási állandók meghatározása mellett alkalmas enzimes hasítás valós-idejű megfigyelésére is.

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani konzulenseimnek: Dr. Horváth Róbertnek, a Nanobioszenzorika Laboratórium vezetőjének és Dr. Bonyár Attila egyetemi docensnek kiemelkedő szakmai segítségükért, támogatásukért, és a bizalmukért, mellyel kitüntettek.

Köszönettel tartozom Dr. Vonderviszt Ferencnek, illetve Dr. Járvás Gábornak, akik a munkám során felhasznált anyagokat biztosították.

Hálás köszönet illeti Majoros Barbarát és Magyaródi Beatrixot, akikhez bármilyen felmerülő kérdésemmel fordulhattam, és jószívvel álltak rendelkezésemre.

Köszönöm a Nanobioszenzorika Laboratórium minden egyes tagjának kutatómunkám során nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom a családomnak és a barátaimnak, akik mindvégig támogattak, biztattak munkámban.

## IRODALOMJEGYZÉK

[1] Jankovics, H., Kovacs, B., Saftics, A., Gerecsei, T., Tóth, É., Szekacs, I., Vonderviszt, F., & Horvath, R. (2020). Grating-coupled interferometry reveals binding kinetics and affinities of Ni ions to genetically engineered protein layers. *Scientific reports*, 10(1), 22253. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79226-w>

[2] Peter Kozma, András Hámori, Sándor Kurunczi, Kaspar Cottier, Robert Horvath. (2011). Grating coupled optical waveguide interferometer for label-free biosensing., *Sensors & Actuators: B. Chemical* 155 (2). pp. 446-450., 0925-4005, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.12.045>

[3] Patko, D., Cottier, K., Hamori, A., & Horvath, R. (2012). Single beam grating coupled interferometry: high resolution miniaturized label-free sensor for plate based parallel screening. *Optics express*, 20(21), 23162–23173. <https://doi.org/10.1364/OE.20.023162>

[4] Chekol Abebe, E., Tilahun Muche, Z., Behaile T/Mariam, A., Mengie Ayele, T., Mekonnen Agidew, M., Teshome Azezew, M., Abebe Zewde, E., Asmamaw Dejenie, T., & Asmamaw Mengstie, M. (2022). The structure, biosynthesis, and biological roles of fetuin-A: A review. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 945287. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.945287>

[5] Damborský, P., Švitel, J., & Katrlík, J. (2016). Optical biosensors. *Essays in biochemistry*, 60(1), 91–100. <https://doi.org/10.1042/EBC20150010>

[6] Naresh, V., & Lee, N. (2021). A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 21(4), 1109. <https://doi.org/10.3390/s21041109>

[7] Chen, C., & Wang, J. (2020). Optical biosensors: an exhaustive and comprehensive review. *The Analyst*, 145(5), 1605–1628. <https://doi.org/10.1039/c9an01998g>

[8] Brockhausen, I., Schutzbach, J., & Kuhns, W. (1998). *Glycoproteins and their relationship to human disease. Acta anatomica*, 161(1-4), 36–78. <https://doi.org/10.1159/000046450>

[9] Sarkadi, L. (2007). *Biokémia mérnök szemmel. Typotex kiadó*

[10] Li, Y., Tran, A. H., Danishefsky, S. J., & Tan, Z. (2019). *Chemical biology of glycoproteins: From chemical synthesis to biological impact. Methods in enzymology*, 621, 213–229. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.02.030>

[11] Ramazi, S., & Zahiri, J. (2021). *Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. Database: the journal of biological databases and curation*, 2021, baab012. <https://doi.org/10.1093/database/baab012>

[12] Harvey D. J. (2005). *Proteomic analysis of glycosylation: structural determination of N- and O-linked glycans by mass spectrometry. Expert review of proteomics*, 2(1), 87–101. <https://doi.org/10.1586/14789450.2.1.87>

[13] Dabrowska, A. M., Tarach, J. S., Wojtysiak-Duma, B., & Duma, D. (2015). *Fetuin-A (AHSG) and its usefulness in clinical practice. Review of the literature. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 159(3), 352–359. <https://doi.org/10.5507/bp.2015.018>

[14] Lin, Y. H., Franc, V., & Heck, A. (2018). *Similar Albeit Not the Same: In-Depth Analysis of Proteoforms of Human Serum, Bovine Serum, and Recombinant Human Fetuin. Journal of proteome research*, 17(8), 2861–2869. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00318>

[15] Karav S., Casaburi G., Arslan A, Kaplan M., Sucu B., Frese F. (2019). *N-glycans from human milk glycoproteins are selectively released by an infant gut symbiont in vivo. Journal of Functional Foods, Volume 61*, 1756-4646. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103485>.

[16] *Creoptix-WAVEsystem guide* (2022).



## INTERNETES HIVATKOZÁSOK

[i1] <https://international.neb.com/products/p0704-pngase-f#Product%20Information>

[i2] <https://www.takarabio.com/products/protein-research/glycobiology/glycopeptidase-f>

[i3] <https://biologydictionary.net/glycoprotein/>

[i4] <https://www.technologynetworks.com/proteomics/articles/an-introduction-to-post-translational-modifications-343603>

[i5] [https://www.malvernpanalytical.com/es/Assets/Brochure\\_WAVEchips\\_2021\\_F\\_tcm61-96085.pdf](https://www.malvernpanalytical.com/es/Assets/Brochure_WAVEchips_2021_F_tcm61-96085.pdf)