



MISKOLCI EGYETEM

Kerpely Antal Anyagtudományok és Technológiák Doktori Iskola

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Mertinger Valéria

Mágneses nanorészecskék fejlesztése és alkalmazása molekuláris biológiai applikációkban

PhD értekezés

Készítette:

Dojcsák Dalma

Okleveles biomérnök

Tudományos vezető:

Dr. Váradi Csaba

Miskolc

2025

Témavezetői ajánlás

A dolgozat célja a mágneses nanorészecskék N-glikozilációs mintázatokban való alkalmazásának vizsgálata volt különböző gyulladásos állapotokban, mint például a sclerosis multiplex, COVID-19 és gyermekkori vakbélgyulladás.

Dalma kutatási munkája során kiemelkedő kreativitással és precizitással közelítette meg a glikánok analízisét, felfedezve azok diagnosztikai potenciálját és biológiai jelentőségét. A dolgozatban bemutatott módszerek innovatívak, és a mágneses nanorészecskék felhasználása a glikánok tisztításában új perspektívát nyújt a molekuláris biológiai kutatásokban.

A dolgozat elkészítése során Dalma nemcsak mély elméleti tudással rendelkezett, hanem a gyakorlati alkalmazások terén is bizonyította szakmai felkészültségét. Az eredmények alapján megfogalmazott tézispontok világosan tükrözik a kutatás során megszerzett ismeretek mélységét és a tudományos gondolkodás érettségét.

Dalma kiválóan teljesítette a kutatási feladatokat, és elkötelezettsége a tudományos munka iránt példaértékű. Javaslom, hogy a jövőben is folytassa kutatásait, mivel képes jelentős hozzájárulást nyújtani a molekuláris biológia és az orvostudomány területén.

Dr. Váradi Csaba

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	- 1 -
1. Irodalmi áttekintés.....	- 3 -
1.1. A glikoziláció biológiai jelentősége.....	- 3 -
1.2. A glikoziláció típusai, különös tekintettel az N-glikozilációra.....	- 4 -
1.2.1. Komplex N-glikánok.....	- 6 -
1.3. Az N-glikánok nomenklatúrája.....	- 7 -
1.4. Az N-glikoziláció szerepe egészséges és beteg állapotokban.....	- 9 -
1.4.1. Egészséges, normál állapotban.....	- 9 -
1.4.2. Krónikus gyulladásos betegségekben.....	- 10 -
1.4.3. Akut gyulladásos betegségekben.....	- 11 -
1.5. Az N-glikoziláció analitikai vizsgálatainak kihívásai.....	- 14 -
1.6. A mágneses nanorészecskék jellemzése és funkciói.....	- 19 -
1.6.1. Mágneses nanorészecskék orvosi alkalmazásai.....	- 20 -
2. Célkitűzések.....	- 22 -
3. Anyagok és módszerek.....	- 23 -
3.1. Felhasznált anyagok.....	- 23 -
3.1.1. Amin-funkcionalizált ferrit alapú mágneses nanorészecskék előállításához.....	- 23 -
3.1.1. N-glikán mintaelőkészítéshez és LC-MS elemzéshez.....	- 23 -
3.2. Amin-funkcionalizált ferrit alapú mágneses nanorészecskék előállítása.....	- 24 -
3.3.2. Felszabadított glikánok fluoreszcens derivatizálása 300 mM ProA-val....	- 27 -
3.3.3. N-glikánok tisztítási módszerei.....	- 27 -

3.3.4. A glikán-tisztítási protokoll automatizálása.....	- 31 -
3.4. N-glikán analízis UHPLC-MS rendszerekben	- 32 -
3.4.1. Alkalmazott Waters UHPLC-MS készülékek.....	- 32 -
3.4.2. Kromatográfiás beállítások és mérési körülmények	- 34 -
3.5. Kiértékeléshez alkalmazott szoftverek és statisztikai tesztek	- 36 -
3.5.1. IBM SPSS Statistics 25	- 37 -
3.5.2. Past 4.02.....	- 38 -
3.5.3. GraphPad Prism 10.1.2.....	- 39 -
3.5.4. Python 3.10.0	- 39 -
3.5.5. GlycoWorkBench 2.1.	- 40 -
3.6. SARS-CoV-2 ELISA immunoassay vizsgálat.....	- 41 -
4. Eredmények.....	- 42 -
4.1. Amin-funkcionalizált MNP-k: összehasonlítás, optimalítás, automatizálás N-glikánokhoz	- 42 -
4.1.1. A különböző ferrit prekursorok hatása az N-glikánok megkötési hatékonyságára	- 43 -
4.1.2. Szárított, glikolos és vizes diszperziós közegek optimalizálása különböző koncentrációk függvényében.....	- 47 -
4.1.3. NiFe ₂ O ₄ -NH ₂ MNP közegeinek optimalizálása különböző elúciós pufferekkel és automatizálási tesztekkel.....	- 51 -
4.1.4. Az MNP alapú glikán-tisztítási protokoll fejlesztésének összefoglalása ..	- 53 -
4.2. Teljes szérum N-glikozilációs vizsgálatok gyulladásos betegségekben....	- 54 -
4.2.1. Sclerosis multiplex.....	- 56 -
4.2.2. COVID-19.....	- 59 -

4.2.3. Gyermekkori akut vakbélgyulladás	- 66 -
4.2.4. Teljes szérum N-glikozilációs vizsgálatok összefoglalása.....	- 73 -
5. Összefoglalás.....	- 74 -
6. Új tudományos eredmények.....	- 81 -
7. Summary	- 83 -
8. Köszönetnyilvánítás.....	- 87 -
9. Értekezéslet alapjául szolgáló közlemények	- 89 -
10. További, referált folyóiratokban megjelenő közlemények	- 89 -
11. További, nem referált folyóiratban megjelenő közlemény	- 90 -
12. Irodalomjegyzék	- 91 -

Rövidítések jegyzéke

A: appendicitis mintacsoport jelölése az appendicitis kísérletben

ACE2 : angiotenzin-konvertáló enzim 2 receptor

ACN: acetonitril (acetonitrile)

AIH: autoimmun hepatitis (autoimmune hepatitis)

ANC: abszolút neutrophil sejtszám (absolute neutrophile cell)

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

AUC: görbe alatti terület (area under the curve)

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

CAT%: azaz relatív abundanciája (fluoreszcens kromatogram csúcs alatti terület százalékos eloszlása)

CE: kapilláris elektroforézis (capillary electrophoresis)

COVID-19: koronavírus betegség (Coronavirus Disease 2019)

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

CSF: cerebrospinalis folyadék (cerebrospinal fluid)

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

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

DNS: dezoxiribonukleinsav (deoxyribonucleic acid)

E1/E2: első elúciós fázis / második elúciós fázis

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

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

FLD: fluoreszcens detektor (fluorescence detector)

Fuc: fukóz (fucose)

FUT7: α -(1,3)- fukoziltranszferáz (α -(1,3)-fucosyltransferase 7)

FUT8: α -(1,6)- fukoziltranszferáz (α -(1,6)-fucosyltransferase)

Gal: galaktóz (galactose)

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

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

HK: hasi fájdalommal rendelkező kontroll csoport az appendicitis kohortban

IBD: krónikus gyulladásos bélbetegség (Inflammatory Bowel Disease)

IgG: immunoglobulin G-típusú antitest (Immunoglobulin G)

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

LC: folyadékkromatográfia (liquid chromatography)

MS: tömegspektrometria (mass spectrometry)

LDA: lineáris diszkrimináns analízis (linear discriminant analysis)

Man: mannóz (mannose)

Milli-Q víz: ultratisztaságú, laboratóriumi célra előállított víz; ellenőrzött vezetőképesség < 18,2 MΩ·cm (ultrapure water)

MNP: mágneses nanorészecske (magnetic nanoparticle)

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

NiFe₂O₄-NH₂ (G): glikolban diszpergált nikkelferrit alapú amin-funkcionalizált mágneses nanorészecske (szárítás nélkül)

NiFe₂O₄-NH₂ (Sz): szárítással előállított nikkelferrit alapú amin-funkcionalizált mágneses nanorészecske

NiFe₂O₄-NH₂ (V): vízben diszpergált nikkelferrit alapú amin-funkcionalizált mágneses nanorészecske (szárítás nélkül)

NK: normál kontroll csoport az appendicitis kohortban

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

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

PEG: polietilén glikol (polyethylene glycol)

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

PLNO: részhurkos injektálás tú túlöntéssel; félautomata mintaadagolási mód (partial loop with needle overfill)

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

ProA: prokainamid (procainamide)

RA: reumatoid arthritis (rheumatoid arthritis)

ROC: karakterisztikus görbeanalízis (receiver operating characteristic)

rpm: percenkénti fordulatszám (revolutions per minute)

RT: retenciós idő (retention time)

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

SM: sclerosis multiplex betegség (multiple sclerosis)

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

SZFF: szabad festék fluoreszcens intenzitás

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

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

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

WBC: fehérvérsejtszám (white blood cell)

WHO: Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

30×, 20×, 15×, 10× MNP hígítások: hígítási fokra utalnak, azaz hogy egy oldat vagy puffer milyen mértékben hígított a kiindulási oldathoz képest

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

Ábrajegyzék

1. **ábra:** A humán N-glikánokra jellemző monoszacharid-összetétel (A) és glikán típusok, a magas mannóztartalmú, hibrid és komplex szerkezetek példáival (B), valamint a komplex glikánok jellemző módosulásainak (pl. fukoziláltság, antennaritás, galaktoziláció, szializáció, szialsav,-és mannóz-kar specifikus kötések) szemléltetése (C). - 6 -
2. **ábra:** A glikán molekulák karakterizálásának lehetséges útvonalai és módszerei..... - 16 -
3. **ábra:** Mágneses nanorészecskével történő glikán tisztítás folyamatábrája..... - 29 -
4. **ábra:** Amid- és amin-funkcionalizált MonoSpin oszlopos készlettel történő tisztítás lépései: a kereskedő oldalán megtalálható folyamatábra kiegészítésével.... - 31 -
5. **ábra:** Hamilton Microlab Prep pipettázó robotikus platform egységeinek ismertetése - 32 -
6. **ábra:** GlycoWorkbench szoftver grafikus felülete (ingyenesen elérhető: <https://glycoworkbench.software.informer.com/2.1/> felületről)..... - 40 -
7. **ábra:** Az amin-funkcionalizált mágneses nanorészecskék (MNP) négy különböző típusának glikánok tisztítására való alkalmasságának értékelése a glikáncsúcs- és SZFF FLR intenzitás értékei alapján. (A) Összesített FLR glikán intenzitás MNP típusok szerint, medián alapján (B) SZFF FLR intenzitás MNP típusok szerint (C) A glikoformák és SZFF párhuzamos mintákra vonatkozó CV-értékek. Az oszlopdiagramok az egyes glikoformák relatív szórását (CV [%]) mutatják, melyek pontos értékei láthatók..... - 46 -
8. **ábra:** Glikán tisztítás különböző koncentrációjú: 16 mg/ml-1, 8 mg/ml-2, 4 mg/ml-3, 2 mg/ml-4, 1 mg/ml-5 és 0,5 mg/ml-6 NiFe₂O₄-NH₂ (Sz) típusú MNP alkalmazásával a 10 legabundánsabb glikoformára nézve (GF: glikoformák). A: fluoreszcens intenzitás értékek ábrázolása. B: csúcs alatti területének százalékos

eloszlása (CAT%). X tengelyen az alkalmazott MNP koncentrációkat tüntettem fel.....	48 -
9. ábra: Glikán tisztítás különböző töménységű (30×-2, 20×-3, 15×-4, 10×-5) NiFe ₂ O ₄ -NH ₂ (G) és koncentrációjú (16 mg/ml-2, 8 mg/ml-3, 4 mg/ml-4, 2 mg/ml-5, 1 mg/ml-6 és 0,5 mg/ml-7) NiFe ₂ O ₄ -NH ₂ (V) MNP protokollok felhasználásával a 10 legabundánsabb glikoformákhoz tartozó FLR intenzitás és CAT% értékek bemutatásával (GF: glikoformák).....	50 -
10. ábra: : Elúciós pufferek hatékonyságának vizsgálata: MNP-alapú és gyári forgalomban kapható amin-és amid-funkcionalizált oszlopok glikán tisztítási protokollokban glikáncsúcs intenzitás CAT% ábrázolásával a 10 legabundánsabb glikoformára nézve, valamint SZFF intenzitás ábrázolása az alkalmazott protokollok hatékonyságának megkülönböztetésére.	52 -
11. ábra: Automatizált MNP-protokoll összehasonlító diagramja a 10 leggyakoribb glikoforma bemutatásával CAT% és fluoreszcens intenzitás [EU] szempontjából (A) Összesített glikáncsúcs intenzitás [EU] ábrázolása. (B) CAT% értékek ábrázolása....	53 -
12. ábra: Kísérleti munkafolyamat a szérum N-glikozilációs mintázatok elemzésére	55 -
13. ábra: A sclerosis multiplex kísérletből fluoreszcens kromatogram (A), valamint a teljes ion kromatogram az elválasztott N-glikánok [m/z] ^{2+/3+} értékei alapján (B). FLR: Fluoreszcens kromatogram, TIC: teljes ion kromatogram.	57 -
14. ábra: Szignifikáns eltéréseket mutató N-glikán szerkezetek a Kontroll és SM mintacsoportok között. A: FA2#1 (RT: 16,07 perc; [842,11] ² ; p=0,04), B: FA2G2S1#16 (RT: 25,89 perc; [1149,74] ²⁺ ; p=0,05), C: A2G2S1#13 (RT: 24,57 perc; [1076,77] ²⁺ ; p=0,01), D: FA2BG2S1#19 (RT: 26,90 perc; [1251,62] ²⁺ ; p=0,01).....	58 -
15. ábra: Lineáris diszkrimináns analízis az SM és Kontroll mintacsoportok elválásának vizsgálatára. Piros színnel jelölve a Kruskal-Wallis tesztben szignifikánsan változott glikán struktúrákat. Fekete félkövér stílussal kiemelt	

glikoformok az LDA analízisben az első két tengely mentén kiemelkedő hozzájárulást mutattak:	59 -
16. ábra: Szializált és neutrális glikánstruktúrák relatív abundanciájának (CAT%) változása a különböző COVID-19 mintacsoportokban.....	63 -
17. ábra: A glikán struktúrák területszázalék-alapú diszkriminációja COVID-19 fertőzésen átesett (pozitív) és COVID-19 fertőzésen nem átesett (Covid-) csoportok között az oltottság függvényébe.....	64 -
18. ábra: A2G2S2#21 és FA2G2S2#23 glikánstruktúrák ROC analízise a fertőzésen való átesettség és az oltottság hatásának elkülönítésére.....	65 -
19. ábra: A Spearman- és Point-Biserial korrelációs elemzés hőterképe, amely az egyes glikáncsúcsok vakbélgyulladás-betegségpontszámra gyakorolt hatását szemlélteti. A 7-nél magasabb értékeket erős korrelációnak tekintettük. (A paraméterpárok közötti korrelációs együtthatók értelmezése: 10^{-1} skálán.).	67 -
20. ábra: CAT% értéktől függően szignifikánsan eltérő glikánstruktúrák mintacsoportok (Kontroll és Appendicitis) közötti szeparációjának vizualizálása pair plot diagramon. A diagramon csak a Mann-Whitney teszt alapján szignifikáns és 0,5 értéktől magasabb CAT%-ú glikánok kerültek feltüntetésre.	69 -
21. ábra: ROC görbe analízis a kontroll és az appendicitis mintacsoportok között a szignifikánsan változott glikán struktúrákra nézve.	70 -
22. ábra: A glikán biomarkerek diagnosztikai potenciálja gyermekkori vakbélgyulladásban.....	71 -
1. ábra_1. sz. melléklet: TEM felvétel a $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (a), $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (b), $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (c) $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (d) nanorészecskékről és a NiFe_2O_4 nanorészecskének az elektron röntgendiffrakciós mintázata (XRD) (e), illetve a mért rácssík-távolság (d-spacing) értéke ångström ben (Å) megadva (f).....	2 -
2. ábra_1. sz. melléklet: Amin-funkcionalizált ferrit alapú mágneses nanorészecskék FTIR (A) és XRD (B) analízisének eredménye.	2 -

Táblázatjegyzék

- 1. táblázat:** Az egészséges állapotra jellemző N-glikozilációs mintázatok, valamint a különböző gyulladásos és fertőzőes betegségekben megfigyelt és szakirodalomban leírt módosulások ismertetése.....- 14 -
- 2. táblázat:** Waters Acquity UHPLC és MS eszközök beállított paraméterei a mérések során.....- 35 -
- 3. táblázat:** ELISA Immunoassay teszt eredményének összefoglalása: a spektrofotometriás abszorbancia és a tesztben alkalmazott küszöbérték alapján meghatározott pozitivitás eredményeket tartalmazva. Abszorbancia küszöbérték: $[A]_{\text{pozitív kontroll}} \times 0,15 = 0,1$; negatív: $[A] < 0,1$; pozitív: $[A] \geq 0,1$- 61 -
- 4. táblázat:** A glikánstruktúrák és betegség közötti korreláció Point-Biserial teszttel és a glikán struktúrák közötti korreláció Spearman-teszttel (zárójelben feltüntetve a korrelációs együttható értékek (R), a hőtésképről). A táblázat alsó részében pedig az adott klinikai paraméter és glikán struktúrák közötti Spearman-teszttel elvégzett korrelációs eredménye. CRP: C-reaktív fehérje, WBC: fehérvérsejtszám, ANC: abszolút neutrofil sejtszám.....- 68 -
- 5. táblázat:** Teljes szérum N-glikozilációs profilok betegségenként - összefoglaló áttekintés- 80 -
- 1. táblázat_1. sz. melléklet:** A ferrit nanorészecskék széntartalma, fajlagos felülete és átlagos részecskemérete (XRD alapján).- 3 -
- 2. táblázat_1. sz. melléklet:** N-glikán mintaelőkészítésben alkalmazott pufferek, oldatok elkészítése, feltüntetve az adott puffer alkalmazási területével.....- 3 -
- 3. táblázat_1. sz. melléklet:** Az automatizálási parancsok sorrendje a Hamilton MicroLab Prep szoftver alapján.....- 4 -
- 4. táblázat_1. sz. melléklet:** Az amin-funkcionalizált mágneses nanorészecskék (MNP) négy különböző típusának glikánok tisztítására való alkalmasságának

értékelése a kromatogramok integrálása alapján meghatározott csúcsintenzitások összehasonlítása alapján.....- 6 -

1. táblázat_2. sz. melléklet: Sclerosis multiplex és kontroll mintacsoportok TSNG analízis statisztikai eredményei.....- 7 -

2. táblázat_2. sz. melléklet: COVID-19 kohorton elvégzett TSNG analízis statisztikai eredményei.- 9 -

3. táblázat_2. sz. melléklet: Appendicitis kohorton elvégzett TSNG analízis statisztikai eredményei.- 12 -

Bevezetés

Az glikoziláció a fehérjék egyik leggyakoribb poszttranszlációs módosulása, amely során cukor (glikán) molekulák kapcsolódnak a fehérje egy aminosavjához, így glikoproteineket alkotva. A glikánok szerkezeti komplexitása és variabilitása jelentősen hozzájárul a fehérjék makro-és mikroheterogenitásához. Emiatt kulcsszerpet játszanak a sejtfunkciók szabályozásában, többek között a sejt-sejt kölcsönhatásokban és az immunválasz kialakításában. A glikoziláció nem templátvezérelt folyamat, hanem az intracelluláris enzimatis és metabolikus környezet dinamikus szabályozása irányítja. Így a cukrok szerkezeti és mennyiségi is változhatnak a különféle kóros állapotokban, mint például krónikus vagy akut gyulladásokban. A glikoziláció kutatásának egyik kiemelt területe az N-glikoziláció vizsgálata, amelyben a glikán egy meghatározott aminosav, jellemzően aszparagin oldalláncához kapcsolódik. Az N-glikánok szerkezeti mintázatának és arányainak változásai fontos információkat nyújthatnak a sejtek állapotáról. Emiatt az N-glikoziláció a biomarker-kutatásban kiemelt jelentőséggel bír [1, 2].

Az N-glikoziláció analitikai vizsgálatában a legmegbízhatóbb és legelterjedtebben alkalmazott technológiák közé tartozik a kapilláris elektroforézis, a folyadékkromatográfia és a tömegspektrometria. Ezeket gyakran kombinálják, hogy teljes és specifikus képet adjanak a glikánmintázatokról. A módszerek nagy felbontást és érzékenységet biztosítanak, ugyanakkor a sikeres elemzés másik kulcsa a gyors, reprodukálható és költséghatékony mintaelőkészítés. Ez továbbra is a glikoanalitika egyik szűk keresztmetszete [3].

Számos szakirodalom tárgyalja a mágneses gyöngy-és mágneses nanorészecske (MNP) alapú glikán kötési protokollokat [4, 5]. Ugyanakkor a ferrit-alapú MNP-k kötési tulajdonságainak finomhangolása, a különböző diszperziós közegek és elúciós pufferek szisztematikus összehasonlítása, valamint az eljárások automatizálhatóságának vizsgálata eddig nem kapott kellő figyelmet [6].

A glikozilációs biomarkerek kutatása számos betegségben ígéretes irányt mutat [7]. Sclerosis multiplex esetében a legtöbb vizsgálat a cerebrospinalis folyadékból izolált IgG glikozilációs mintázatára koncentrált. A teljes szérumban N-glikozilációját kevesebb tanulmány tárgyalja és ezek nem tértek ki a férfi és női betegek elkülönítésére. Ez azért fontos, mert a betegség előfordulása az 50–60 éves korosztályban háromszor gyakoribb a nőknél [8].

A COVID-19 pandémia idején a kutatások főként a teljes plazma és szérumban, illetve az IgG N-glikozilációs mintázatát elemezték a betegség lefolyásának megértése érdekében. Ugyanakkor az mRNS-alapú vakcináció hatásának részletes vizsgálata az N-glikánmintázatra mindeddig kevés figyelmet kapott.

Az akut gyulladásos kórképek között a vakbélgyulladás eddig teljesen feltérképezetlen maradt N-glikozilációs szempontból. Ez különösen jelentős, mivel a jelenlegi diagnosztikai eszközök gyakran nem képesek egyértelműen elkülöníteni az alhasi fájdalommal rendelkező kórképeket. A vakbélgyulladás N-glikozilációs mintázatának feltérképezése ezért kiemelten fontos lehet a pontosabb differenciáldiagnózis és a célzottabb terápiás megközelítések szempontjából.

Kutatásom célja egyrészt egy új, MNP-alapú glikán tisztítási protokoll kidolgozása és optimalizálása. Kiemelt figyelmet fordítok a ferit-alapú mágneses nanorészecskék glikán-specifikus kötési és elúciós feltételeinek, valamint diszperziós közegeinek összehasonlítására és az eljárás automatizálhatóságára. A dolgozat másik részében három gyulladásos betegség - sclerosis multiplex, COVID-19 és akut vakbélgyulladás - teljes szérumban N-glikozilációs mintázatának vizsgálatát mutatom be. Eredményeim kiegészítik a korábbi tanulmányokat, új szempontokkal: sclerosis multiplex esetében nem szerinti bontásban, COVID-19 esetében a betegség súlyossága helyett az mRNS-vakcináltság hatására fókuszálva, valamint egy eddig feltérképezetlen N-glikozilációs mintázat bemutatásával az akut vakbélgyulladásban.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A glikoziláció biológiai jelentősége

A glikoziláció egy olyan poszttranszlációs módosítás, amelynek során cukor-maradványok (glikánok) kapcsolódnak fehérjékhez vagy lipidekhez, így glikokonjugátumokat létrehozva. Ez a módosítás univerzális, mivel mindhárom doménben előfordul: baktériumokban, archeákban és eukariótákban egyaránt. Az eukarióta sejtekben a leggyakoribb poszttranszlációs módosulások közé tartozik. Különböző formákban jelenik meg, például a sejtmembránon, a szekretált fehérjéken és az extracelluláris mátrixban [9]. A fehérje glikozilációja nem templát vezérelt folyamat, mint a fehérjeszintézis vagy DNS-transzkripció. Ehelyett a sejtben belüli enzimatikus és metabolikus környezet által dinamikusan szabályozott. A glikozilációban részt vevő oligoszacharidok nem önállóan szintetizálódnak. A fehérje aminosavjához vagy egy lipidhez kapcsolódva az endoplazmatikus retikulum (ER) felszínén indul meg a folyamat, majd a Golgi-apparátusban fejeződik be aszintézis [10].

A glikoziláció kezdetén a citoplazmában prekursor cukrok aktiválódnak, például az uridin-difoszfát N-acetil-glükózamin (UDP-GlcNAc). Ezeket cukor specifikus transzportfehérjék juttatják az ER vagy a Golgi lumenébe. Ott a glikoziltranszferáz enzimek kapcsolják a glikánokat a fehérjék megfelelő aminosavaira. A bioszintézis szabályozása több tényezőtől is függ, mint a prekursor cukrok mennyiségétől, a glikoziltranszferáz enzimek expressziójától és aktivitásától, valamint az organelumokon belüli enzimek lokalizációjától. Ez a komplex szabályozás okozza, hogy a glikoziláció, sejtípus-, fehérje- és még glikozilációs hely-specifikusan is változhat. Így jön létre a „glikán kód” sokszínű funkciója [11, 12].

A glikánok szerepet játszanak a fehérjék életciklusának szabályozásában - például a rosszul hajtogatott fehérjéket glikánmintázat alapján ismerik fel a specifikus UDP-glükóz glikoziltranszferáz enzimek, amik hozzájárulnak, ahhoz, hogy ezeket a hibás konformációjú fehérjéket a proteoszóma lebontsa [1, 2]. A glikánok kulcsszerepet játszanak a fehérjék térszerkezetének és stabilitásának kialakításában.

Jelentősek a sejt-sejt kölcsönhatásokban, mint például a petesejt és a spermium közötti fajspecifikus felismerés: a petesejt glikánjaihoz kötődő spermium lektinek indítják el a két ivarsejt közötti fúziós reakciók [13]. A glikoziláció hatással van az immunválasz szabályozására is. Az immunrendszer felismeri a „kóros” vagy „idegen” glikánmintázatokat, például a vírusos vagy tumorsejtes fehérjéket. Ebben a folyamatban az idegen fehérjék glikoziláltsága erősen befolyásolja, hogy az immunrendszer mennyire képes felismerni és immunválaszt kialakítani a testidegen sejtek ellen.

1.2. A glikoziláció típusai, különös tekintettel az N-glikozilációra

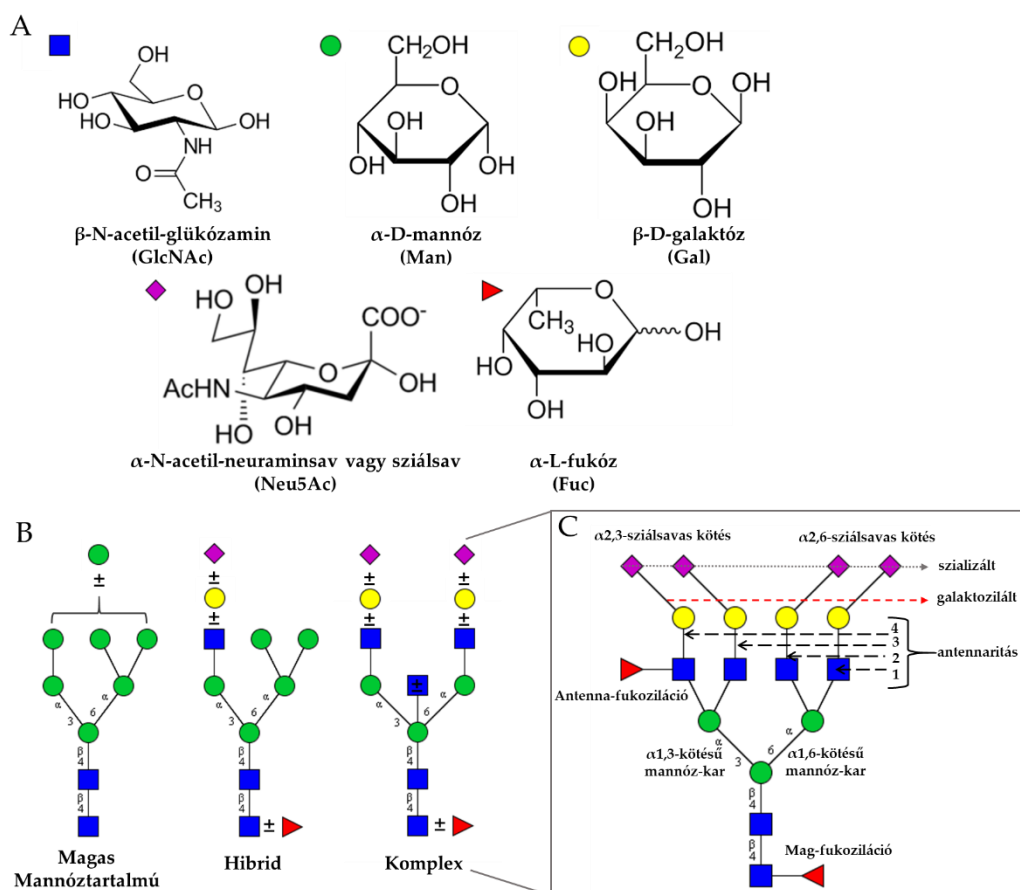
A glikoziláció típusait a glikán-fehérje kapcsolódási módja alapján három fő csoportba soroljuk: N-glikoziláció, O-glikoziláció és C-mannoziláció.

Az N-glikoziláció a legjelentősebb és legösszetettebb forma. Ez azzal is magyarázható, hogy az eukarióta fehérjeszintézis során az N-glikánok épülnek be elsőként az ER-be [14]. Az N-glikoziláció során a N-acetil-glükózamin (GlcNAc) molekula az aszparagin (Asn) oldallánc nitrogénjéhez kapcsolódik, az Asn-X-Ser/Thr szekvenciamotívumon keresztül. Itt az X bármilyen aminosavlehet, kivéve a prolint. A humán glikoproteinek körülbelül 75%-a tartalmaz legalább egy N-glikozilációs kötőhelyet, így ez a legdominánsabb glikozilációs típus [12, 15]. Jelentős szerepet játszik az immunfunkciók meghatározásában. Példa erre az antitestek Asn297 pozícióban található konzervált glikánkötő helye. Az immunoglobulin G (IgG) anti- és pro-inflammatorikus hatását, az antitesten található N-glikoziláció típusa befolyásolja [16]. Emellett a jelátvitelben és sejtfelismerésben is meghatározó, például a malária elleni védekezésben [17, 18].

A humán N-glikozilált glikoproteineket ötféle monszacharid építi fel: β -N-acetil-glükózamin (GlcNAc), α -D-mannóz (Man), β -D-galaktóz (Gal), α -L-fukóz (Fuc), és α -N-acetil-neuraminsav (Neu5Ac). A Neu5Ac a leggyakoribb szíálsav, ezért a szakirodalomban gyakran egyszerűen „szíálsavként” említik. Az N-gliká-

nok bioszintézise ER-ben kezdődik és a Golgi-készülékben fejeződik be. Eredményként egy legalább öt monoszacharidból álló mag-régió alakul ki, amely minden N-glikánban azonos ($\text{Man}(\alpha 1-6)\text{-Man}(\alpha 1-3)\text{-Man}(\beta 1-4)\text{-GlcNAc}(\beta 1-4)\text{-GlcNAc}(\beta)\text{-Asn}$). Erred épülnek a további cukoregységek. Alapvetően az N-glikánok között három fő csoport különíthető el, attól függően, hogy a mag-régióhoz milyen sorrendben és milyen típusú monoszacharidok kapcsolódnak: magas mannóz tartalmú, hibrid és komplex glikánok (1. ábra).

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



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

1.2.1. Komplex N-glikánok

Antennaritás és biszektiláció: a komplex szerkezet már a nevéből adódóan is nagyobb szerkezeti változatosságot tesz lehetővé, így ez az N-glikán típus felel elsősorban a humán glikoproteinek makroheterogenitásért. A komplex N-glikánok magrégiójához további GlcNAc egységek kapcsolódnak, amelyek kialakítják az úgynevezett antennás szerkezetet. Ez lehet mono-, di-, tri- vagy tetra-antennás elágazás. Mono-antennás glikánok esetében különösen fontos a magstruktúrában található α1,6- és α1,3-kötésű mannóz-karok szerkezete, mivel ennek alapján kétféle

izomer különíthető el. A biszektiláció egy további specifikus jellemző, amikor egy további GlcNAc egység β 1,4-kötésen keresztül kapcsolódik a központi mannózhoz.

Terminális összetétel: a komplexitás kiterjed az oligoszacharid láncvégi, azaz terminális szénhidrát összetételre is. Ha a nem-redukáló (terminális) végen galaktóz található, a glikánt galaktoziláltnak, míg szíálsav esetén szializáltnak nevezük. A terminális galaktóz miatt ezek az oligoszacharidok fiziológias pH-n nem hordoznak elektromos töltést, ezért neutrális glikánoknak nevezik. Ezzel szemben a terminális szíálsav jelenléte negatív töltést eredményez, mivel a szíálsav karboxilcsoportja savas jellegű és disszociált állapotban van. A szíálsav mennyisége és térállása (α 2,3,- vagy α 2,6-specifikus kötés) önmagában is tovább növeli komplex N-glikánok variabilitását [19].

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

Összességében az N-glikánok kapcsolódási módjai (α/β térállás, a glikozidos-kötés például α 1,2, - β 1,4-típusai) rendkívül sok izoformát hoznak létre. Ez jelentősen növeli a cukrok mikroheterogenitását.

1.3. Az N-glikánok nomenklatúrája

Az 1970-es évekig a glikánszerkezeteket a standard IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) rendszer alapján nevezték el. A glikánok elágazó szerkezete, izomériájuk sokfélesége és poszttranszlációs variabilitásuk azonban megnehezíti nemcsak vizsgálatukat, hanem elnevezésüket is. A glikomikai kutatások előrehaladásához ezért elengedhetetlen egy egységes, jól értelmezhető jelölési rendszer, amely a szerkezeti információk vizuális és közérthető megjelenését biztosítja.

Az első, széles körben elterjedt szimbólumrendszert Kornfeld és munkatársai vezették be 1978-ban. Ezt később az *Essentials of Glycobiology* könyv szerkesztői egységesítették, majd SNFG (Symbol Nomenclature for Glycans) néven szabványosították [20-22]. Az SNFG rendszer különböző színű és formájú geometriai alakzatokkal ábrázolja az egyes monoszacharidokat, ezzel támogatva a glikánok gyors felismerését és összehasonlítását. Például a kék négyzet a GlcNAc, a zöld kör a Man, a sárga kör a Gal, a lila rombusz vagy csillag a Neu5Ac a piros háromszög a Fuc cukrokat jelentik. Ez a vizuális rendszer mára nemcsak a szakirodalomban, hanem adatbázisokban (pl. GlyTouCan, UniCarbKB, GlycoWorkBench) és szoftverekben is széles körben használt [23-25].

A szimbólumrendszer mellett fontos az egységes szöveges nomenklátúra is. Napjainkban, legszélesebb körben az oxfordi nomenklatúrát alkalmazzák, amit Harvey és munkatársai vezettek be. A glikán szerkezetek leírására kompozicionális nevezéktant is használnak, amely a glikánban található különböző monoszacharid egységek számát tünteti fel. Ez a rendszer egy összegző információt ad, de nem tartalmaz adatot az elrendezésről (pl. elágazások vagy kötéstípusok) [26]. Az oxfordi nomenklátúra ezzel szemben már szerkezeti jellemzőket is kifejez: elágazás (A), galaktóz (G), szialsav (S), mag-fukóz (F), biszektilált GlcNAc (B), mannóz (M). Például az FA2G2 jelölés fukozilált, di-antennás és két terminális galaktóz tartalmazó cukor az Oxford jelölés szerint, amit kompozicionálisan H5N4F1 képlettel lehet megadni. A számok az adott jellemzők mennyiségét jelölik [21].

-Mag-struktúra: A2 - két antennás, afukozilált

- A2(6) - α 1,6-kötésű mannóz-kar,
- A2(3) - α 1,3-kötésű mannóz-kar

-Antennaritás: A1-A4 – mono → tetra-antennás

-Galaktoziláció: A1G1, A2G1 – mono; A2G2 – di; A3G3 – tri; A4G4 - tetra-galaktozilált

-Biszektiláció: A2B, A2BG1, A2BG2

-Szializáció: A1G1S1, A2G1S1, A2G2S1 – mono; A2G2S2, A3G3S2, A4G4S2 – di; A3G3S3, A4G4S3 – tri; A4G4S4 – tetra-szializált

-Fukoziláció: FA2, FA1, FA2, FA3, FA4, FA1G1, FA2G1, GA2G2, FA3G3, FA4G4, FA2B, FA2BG1, FA2BG2, FA1G1S1, FA2G1S1, FA2G2S1, FA2G2S2, FA3G3S2, FA4G4S2, FA3G3S3, FA4G4S3, FA4G4S4

1.4. Az N-glikoziláció szerepe egészséges és beteg állapotokban

Az N-glikánok szerkezete és összetétele egészséges állapotban is jelentős egyéni, valamint sejttípus-specifikus variabilitást mutat, amelyet számos biológiai tényező befolyásol. Az alpmintázatok ismerete nélkülözhetetlen a kóros körülmények között - például krónikus vagy akut gyulladásban, illetve vírusfertőzések során - bekövetkező változások megértéséhez [14]. Az alábbi alpontok az egészséges állapotra jellemző glikozilációs mintázatokat, valamint a különböző gyulladásos és fertőzőes betegségekben megfigyelt, szakirodalomban leírt módosulásokat. Ezek összefoglalását az 1. táblázat tartalmazza.

1.4.1. Egészséges, normál állapotban

Az N-glikozilációs változások gyulladásos betegségekben vagy más kóros állapotokban csak akkor érthetők meg, ha először az egészséges állapot jellemzőit térképezzük fel. Ez azonban a cukormolekulák variabilitása és komplexitása miatt nem egyszerű. A glikoziláció bioszintetikus útvonala normál körülmények között is számos faktortól függ: cukor monomerek koncentrációjától, a glikoenzimek típusától és expressziós szintjétől. Az enzimek sejtspecifikus jelenléte is meghatározó. Például a májsejtekben magas a mag-fukozilációért felelős FUT8 enzim expressziós szintje, míg az immunsejtekben inkább az antenna- fukozilációért felelős FUT7 enzim dominál [27, 28]. Az egészséges, azaz a sejt normál állapotában a humán vér glikoproteinjeinek mintázatában gyakoriak a mag-fukozilált komplex N-glikánok, különösen az IgG, haptoglobin és más máj eredetű fehérjék esetében. A szérumban található glikoproteinek többsége di- és tri-antennás komplex glikánokat hordoz,

amelyek között a galaktozilált és szializált formák dominálnak [7]. A szialsav jelenléte – különösen az α 2,6-szialsavas kötésű izoformák – az egészséges szérum glikánprofil egyik fő jellemzője. A leggyakoribb máj eredetű glikoprotein, az α 1-antitripszin is nagyrészt α 2,6-glikozidos kötésű szialsavas glikánokat hordoz [29, 30].

A glikánmintázatokat számos egyéni faktor is befolyásolja, mint például a dohányzás, az életkor vagy a nem [31, 32]. Gordan Lauc és munkatársai részletesen feltérképezték a humán vér N-glikozilációs profilját különböző életkorú csoportokban. Eredményeik szerint az agalaktozilált glikánok és a biszektilált GlcNAc-t tartalmazó glikoformák mennyisége nő az életkor előrehaladtával, míg a mag-fukozilált glikánok aránya csökken [29, 33].

1.4.2. Krónikus gyulladásos betegségekben

A krónikus gyulladás hosszan fennálló, alacsony vagy közepes intenzitású immunválasz, amely tartós szövetkárosodással és az immunrendszer folyamatos aktivációjával jár. Krónikus gyulladásos betegségekben - például a reumatoid arthritis (RA) [34, 35], gyulladásos bélbetegségben (IBD) [36], vagy autoimmun hepatitisben (AIH) [37] - a glikozilációs mintázat jelentősen megváltozik. A teljes vér glikoprofiljában általánosan megfigyelhető, hogy csökken a galaktoziláció és szializáció, miközben nő a biszektilált GlcNAc tartalom. Gyakori továbbá a fukoziláció mértékének változása is [29, 33].

Sclerosis multiplex (SM)

Az RA és AIH mellett a sclerosis multiplex (SM) szintén autoimmun eredetű betegség, amely neurodegeneratív folyamatokat okoz a mielinhüvely elleni kóros immunválasz révén. A WHO legfrissebb statisztikai adatai szerint világszerte mintegy 1,8 millió embert érint, és a nők körében háromszor gyakoribb [8]. Az SM és az N-glikoziláció kapcsolatát először M. Wuhrer, illetve Y. Decker írták le. A cerebrospinalis folyadékból (CSF) származó IgG vizsgálataiban, Wuhrer és társai a biszektilált GlcNAc emelkedését, valamint a galaktoziláció és fukoziláció csökkené-

sét mutatták ki. Ezeket a változásokat a CSF eredetű IgG pro-inflammatorikus jellemzőjeként értékelték. Decker cikke szintén kiemelte, hogy a galaktoziláció csökkenése összefügg a betegség progressziójával [38, 39]. Ez a sajátos glikánmintázat, a CSF-re specifikus IgG (oligoklonális IgG) jelenlétével együtt egyedi immunválaszt feltételez az SM betegségben [40].

Ana Cvetko és munkatársai 2020-ban a plazmafehérjék és a plazma eredetű IgG N-glikozilációját vizsgálták folyadékkromatográfiával és fluoreszcens detektálással. A plazma glikoproteinek esetében hangsúlyozták az antennáris fukoziláció, valamint a tri- és tetra-antennás galaktoziláció jelentőségét. A vizsgálatot kiegészítették a plazmaeredetű IgG csökkent mag-fukóz tartalmú glikoformáinak azonosításával. Összességében a plazma komplex glikoformáinak aránya nőtt, míg az IgG afukozilációja fokozódott az egészséges kontrollhoz képest [41]. Egy másik kutatás a szérum- és a CSF eredetű IgG-t hasonlította össze. Eredményeik szerint a szérumból származó IgG magasabb szializáltsággal és galaktoziláltsággal rendelkezik, mint a CSF eredetű IgG [42]. Bár az SM glikánváltozásait többnyire a CSF- és plazma-eredetű IgG analízisére írták le, a teljes szérum mintázat nemi különbségeinek szisztematikus feltárása hiányzik. Ennek vizsgálata időszerű, mert a z SM előfordulása háromszor gyakoribb a nőknél, mint a férfiaknál, így a nemi különbségek feltárása klinikai és biomarker szempontból is pontosabb megkülönböztetést tehet lehetővé.

1.4.3. Akut gyulladásos betegségekben

Az akut gyulladás a szervezet gyors válaszreakciója fertőzésre, szövetkárosodásra vagy más károsító ingerekre. Ilyenkor jelentős poszttranszlációs és szerkezeti változások mennek végbe a vérplazma fehérjében. Akut gyulladás során számos szérum glikoprotein - például az immunoglobulinok, a haptoglobin, az akut fázisfehérjék (pl. α 1-antitripszin) - glikozilációja is módosul [43-45]. A teljes szérum N-glikánmintázatban akut gyulladás esetén az A2F glikánokon fokozódik a galak-

toziláció és szializáció, ami az IgG-hez képest az IgM arányának és jelenlétének fokozódására utal. Az IgM a szervezetben jellemzően az akut gyulladásos fennállásának indikátora [46]. Az akut fázisfehérjék - amelyek eleve több antennával rendelkező glikánokat hordoznak - ilyenkor még komplexebb, több elágazást tartalmazó szerkezeteket alakítanak ki. [45]. Ezek a változások közvetlenül befolyásolják a fehérjék immunmoduláló funkcióit. Az agalaktozilált IgG glikánok pro-inflammatorikus hatásúak, azaz fokozzák a gyulladásos választ. Ezzel szemben a szialsavban gazdag, teljesen galaktozilált vagy biszektilált struktúrák gyakran anti-inflammatorikus, gyulladáscsökkentő jelleget mutatnak.

Az N-glikozilációs profil vizsgálata ezért nemcsak a gyulladás jelenlétéről ad információt, hanem segít annak jellegét - akut vagy krónikus - is meghatározni. Az akut gyulladás N-glikozilációs profilját vizsgáló tanulmányok születtek többek között bakteriális tüdőgyulladás (pneumonia), vírusos COVID-19 fertőzés, valamint hasi műtétek utáni szisztémás gyulladás kapcsán [26, 47, 48].

COVID-19

A vírusos fertőzések során az immunrendszer gyors és összetett válaszreakciót indít el, amely jelentős változást okozhat a szervezet glikozilációs mintázataiban. A 2019-ben megjelent súlyos akut légzőszervi szindrómát okozó koronavírus-2 (Sars-CoV-2 vagy COVID-19) világjárványa emberek millióit érintette és a legtöbb országban több fertőzési hullámban zajlott le [49]. A COVID-19-et a súlyos akut légúti szindrómát okozó koronavírus 2 (SARS-CoV-2) okozza, amely az angiotenzin-konvertáló enzim 2 (ACE2) receptoron keresztül jut be az emberi sejtekbe [50]. A járvány megfékezésének egyik legfontosabb stratégiája a SARS-CoV-2 vírus elleni védőoltások alkalmazása volt. Ennek köszönhetően csökkent a fertőzések időtartama, és a pozitív esetek száma is [51]. Az elsőként jóváhagyott immunizációs eljárások az mRNS-alapú vakcinák, amelyek a koronavírus tüskefehérjéje ellen termeltek antitesteket. Számos tanulmány vizsgálta hogyan változott a N-glikoziláció a COVID-19 hatására [26, 52-54]. Elemezték a teljes szérum és plazma glikánmintázát [26, 55, 56], a szérum eredetű IgG-t [57, 58], valamint a tüskefehérje-specifikus

IgG-t is [53, 54]. Bladergroen és munkatársai kimutatták, hogy a COVID-19-betegek teljes szérumában nőtt a tri- és tetra-antennás, különösen $\alpha 2,6$ -kötésű szializált glikánok aránya. Ezzel párhuzamosan a biszektilált, mag-fukozilált szerkezetek és az oligomannózok aránya csökkent, főként a súlyos esetekben [26]. Hasonló eredményekről számoltak be más tanulmányok is: emelkedett di-szializáció, valamint oligomannóz-tartalom mellett csökkent aszializációt (A2G2 struktúrák) figyeltek meg a COVID-19 betegekben. Ezek a változások az akut fázisú fehérjék és a gyulladásos válasz glikozilációs eltéréseihez köthetők [52].

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

Egyéb akut gyulladásos folyamatok

Akut gyulladás során a szervezet gyorsan reagál különböző károsító ingerekre. Ilyenkor kulcsfontosságú biomarkerek, például a C-reaktív fehérje (CRP) vagy egyes citokinek, mint az interleukin-6 (IL-6) szintje emelkedik. A máj által szintetizált akut fázisfehérjék, mint a haptoglobin, az $\alpha 1$ -savanyú glikoprotein, az $\alpha 1$ -antitripszin – szintén glikoziláltak [44, 59]. Ezek glikozilációs mintázata betegség-specifikusan változik, különösen az N-glikoziláció módosulásában. Például a $\alpha 1$ -savanyú glikoprotein esetében akut gyulladás hatására fokozottan jelennek meg a di-antennás glikánok, ami krónikus betegségeken nem jellemző [60]. Az $\alpha 1$ -antitripszin esetében a szialsavat tartalmazó N-glikánok a gyulladás állapotától függően emelkedtek meg [44]. Egy 2016-os vizsgálatban a klinikai hasi műtétek utáni szisztémás gyulladás és a teljes plazma N-glikánmintázatát elemezték. Azt találták, hogy 12, 24 és 48 óra elteltével jelentős változások következtek be: emelkedett a di-szializált glikánok aránya, csökkent a mag-fukozilált di-antennás glikánok mennyisége és nőtt a mag-fukozilált tri- és tetra-szializált glikánoké [48].

Miközben a jelenlegi diagnosztikai eszközök gyakran nem elégségesek az alhasi fájdalom pontos okának elkülönítésére, az appendicitis N-glikozilációs jellemzői hiányosan ismertek. Ez különösen fontos probléma, mivel a bizonytalan esetekben sokszor szükségtelen műtétekre is sor kerülhet. A biomarker-kutatás ezért időszzerű és jelentős, mert hozzájárulhat a vakbélgyulladás megbízhatóbb felismeréséhez és a differenciáldiagnosztika javításához.

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

Kohort megnevezése		Jellemző glikánmintázat	Specifikusság
Egészséges, normál állapot		mag-fukozilált komplex glikánok	máj eredetű fehérjék [29]
		di- és tri-antennás komplex glikánok, galaktóz és szialsav dominanciával	szérum glikoproteinek általános jellemzője [7]
		α 2,6-szialsavas kötési izoformák	α 1-antitripszin jellemző glikoforma [30]
Krónikus gyulladás	általánosságban	agalaktoziláció, aszializáció, biszektilált GlcNAc	szérum és IgG glikoprofilban egyaránt [33]
	sclerosis multiplex	agalaktoziláció, biszektilált GlcNAc, afukoziláció	CSF IgG [38, 39]
		antenna fukoziláció tri- és tetra-antennás galaktoziláció és szializáció	plazma fehérjék [41]
		afukoziláció, szializáció és mono-galaktoziláció	plazma IgG [41, 42]
Akut gyulladás	általánosságban	multi-antennaritás	akut fázisfehérjék [45]
		A2F glikánok fokozott szializációja és galaktozilációja	szérum fehérjék [46]
		diantennaritás emelkedése	α 1-savanyú glikoprotein [60]
		szializáció emelkedése	α 1-antitripszin [44]
	hasi műtét utáni állapot	mag-fukozilált tri- és tetra-szializáció fokozódása és mag-fukozilált di-antennaritás csökkenése	plazma fehérjék [48]
	COVID-19	tri- és tetra-antennás, α 2,6-szializált glikánok emelkedése és biszektiláció, aszializáció és oligomannózok csökkenése	plazma fehérjék [26, 52]

1.5. Az N-glikoziláció analitikai vizsgálatainak kihívásai

A glikomika a sejtek és szervezetek glikán készletének (glikom) szerkezeti és funkcionális feltérképezésével foglalkozó tudományág. Szorosan kapcsolódik az új

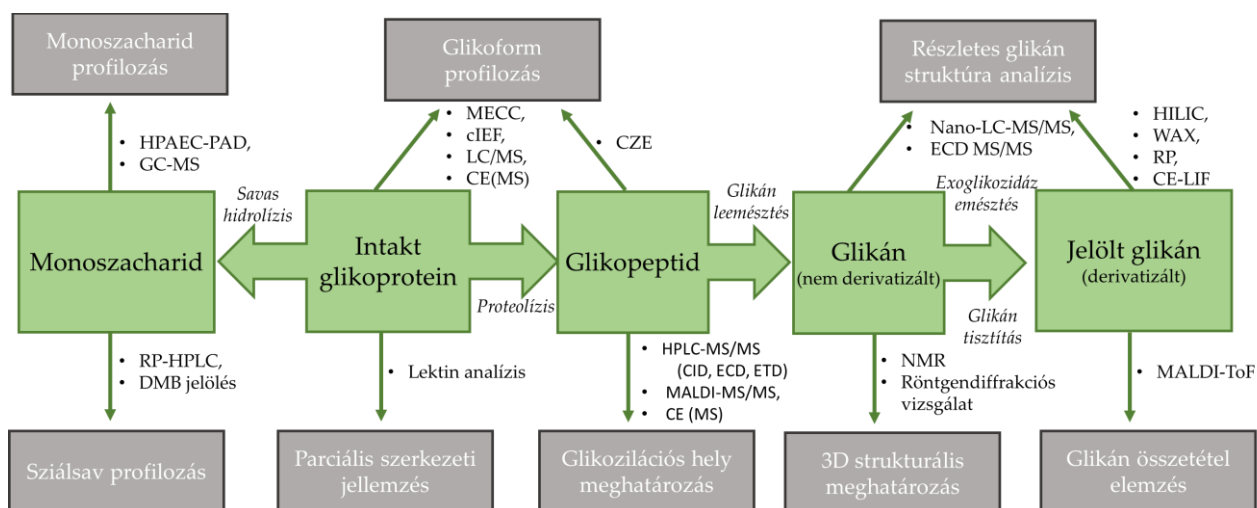
generációs, automatizált mintaelőkészítési eljárásokhoz, valamint a nagy áteresztőképességű (high-throughput, HTP) analitikai technológiák fejlődéséhez [61]. Az 1. ábra összefoglalja a napjainkban alkalmazott legfontosabb HTP glikoanalitikai módszereket. Ezek közül a leggyakoribb a folyadékkromatográfia (LC), a tömegspektrometria (MS), a kapilláris elektroforézis (CE), illetve ezek különböző kombinációi. Előnyük, hogy gyorsak, robusztusak és nagy felbontású, akár szerkezet-specifikus információt is nyújtanak a glikokonjugátumokról. Ezek a módszerek kombinálhatók szabványosított, automatizált munkafolyamatokkal, valamint integrált szoftverplatformokkal, amelyek statisztikai feldolgozást is lehetővé tesznek, figyelembe véve a biológiai variabilitást (pl. nem, életkor, gyulladásos vagy egyéb klinikai paraméterek) [19].

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

A megbízhatóság növelése érdekében előkészítő lépésekre van szükség, például derivatizálásra. A derivatizálás olyan kémiai módosítás, amely során a kiindulási molekula egy származéka képződik. Gyakran alkalmazott módszer a fluoreszcens vagy permetilezéses derivatizálást [6, 62]. Ez a detektálhatóság fokozását, az ionizációs hatékonyság javítását, a jel/zaj arány növelését, valamint az izoformák elkülönítését szolgálja. A fluoreszcens származékképzés során a glikánok redukáló végén fluoreszcens festék kapcsolódik az GlcNAC - például 2-aminobenzamiddal (2-AB) vagy prokainamiddal (ProA)- történik a molekulák címkézése [63].

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

- **Intakt glikoprotein analízis:** a teljes fehérje és glikoziláció vizsgálata, amely átfogó információt ad a glikoformák és más poszttranszlációs módosítások kapcsolatáról, de nem különíti el az O-és N-glikozilációt, sem a glikoziláció aminosav szekvenciáját [64, 65]
- **Glikoprotein elemzés:** tripszines enzimatis hasítással peptidek vizsgálata lehetővé teszi a glikozilációs helyek szerinti elemzést [66, 67]
- **Felszabadított N-glikánok analízise:** PNGase F enzimmel felszabadított glikánok szerkezeti vizsgálata derivatizálást követően. LC-MS esetén fluoreszcens címkézés szükséges, MS/MALDI esetén más derivatizálási módszerek is alkalmazhatók, például etil-észterifikáció [3, 6].



2. ábra: A glikán molekulák karakterizálásának lehetséges útvonalai és módszerei.

Rövidítések: HPAEC-PAD: nagy felbontású anioncserélő kromatográfia pulzáló amperometriás detektálással; GC-MS: gáz kromatográfia tömegspektrometriai detektálással; MECC: micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfia; cIEF: kapilláris izoelektromos fókuszálás; LC/MS: folyadékkromatográfia tömegspektrometriai detektálással; CE(MS): kapilláris elektroforézis (tömegspektrometriai detektálással); CZE: kapilláris zóna elektroforézis; ECD: elektronbefogási disszociáció; HILIC: hidrofíli kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfia; WAX: gyenge anioncserélő; RP-HPLC: reverz-fázisú folyadékkromatográfia; CE-LIF: kapilláris elektroforézis lézer indukált fluoreszcens detektálással; DMB jelölés: 2-

((3', 5'-dimetil-4'-hidroxifenil)-azo)-benzoesav; MALDI: mátrix asszisztált lézer deszorpció ionizációs tömegspektrométer; MS/MS: tandem tömegspektrometria; NMR: mágneses magrezonancia; ToF: „Time of flight” tömegspektrometriai detektálás [2].

1.5.1. HILIC-alapú fluoreszcens glikánanalízis áttekintése

A hidrofil kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfia (HILIC) az elmúlt évek során az N-glikozilációra irányuló folyadékkromatográfiai mérések vezető módszerévé vált. A HILIC alapú módszer megfelelő a vízdékony, poláros oligoszacharidok, különösen azok szerkezeti izomerjeinek elválasztására. A komplex glikánok esetében a mannózkarokon megjelenő α 1,6- és α 1,3-glikozidos kötésű izomerek elkülönítése más módszerekkel nehéz lenne. A HILIC módszerben a retenció a glikánok hidrofil tulajdonságain alapul, amelyeket a méret, a töltés, az elágazások száma és a monoszacharid-összetétel határiz meg. Az alacsony pKa-jú mozgófázis (jellemzően magas acetonitril tartalmú oldószer) elősegíti a finom szerkezeti különbségek szerinti elválasztást. A savas közeg protonált állapotban tartja a savas funkciós csoportokat, ezáltal csökkenti az ionizációból származó szekunder kölcsönhatásokat [68, 69]. A fluoreszcens kromatogramokon a glikoformák hidrofilitás szerint eluálódnak az oszlopról: a kevésbé poláros (pl. neutrális - FA2, A2G2) glikánok rövidebb retenciós idővel, míg a polárosabb (pl. szíalsavat tartalmazó - A2G2S1, FA3G3S3) struktúrák hosszabb retenciós idővel jellemezhetők.

Az új generációs ultranagy nyomású LC rendszerekben (UPLC/UHPLC) a HILIC oszlopok kialakítása jelentősen növeli a kromatográfiás hatékonyságot. Például a részecskeméret $< 2 \mu\text{m}$ töltettel rendelkező állófázisok olyan finom eltérések elkülönítését is lehetővé teszik, mint a biszektilált N-acetil-glükózamin és annak analógja [70-72]. Ez különösen fontos klinikai szempontból, mivel a biszektilált GlcNAc egység kialakításáért felelős enzim, a N-acetil-glükózaminil-transzferáz III aktivitása kimutathatóan csökkenti a daganatos áttétképződést [68].

Ahogy az korábban már említésre került, a szénhidrátok ionizációja természetes formájukban gyenge, mivel nem tartalmaznak UV-elnyelő (kromofór) vagy

fluoreszcens (fluorofór) csoportokat. Ezért a fluoreszcens jelölés kulcsfontosságú a nagy érzékenységű detektáláshoz, különösen HILIC-FLR-MS mérésekben. A klaszikusan alkalmazott jelölőszer a 2-AB alkalmazása, amely sztöchiometrikusan 1:1 arányban kapcsolódik a glikánok redukáló végével, lehetővé téve a kvantitatív relatív mennyiségi analízist. Hátránya azonban az alacsony ionizációs hatékonyság, amely korlátozza az eletrospray ionizációs (ESI-MS) érzékenységet [73]. Egy újabb generációs jelölőanyag, például a ProA, bázikus terciér amin oldalláncokat tartalmaz, ami a protonaffinitást, ezáltal jelentősen fokozza az ESI-MS módszer érzékenységét [3]. A ProA ugyanazon reduktív amination mechanizmus mentén kapcsolódik a glikánokhoz, mint a 2-AB, viszont nagyobb fluoreszcenciát és fokozott MS jelintenzitást biztosít. Az irodalmi adatok alapján még a HILIC-LC elválasztásban is különbséget mutat: míg a 2-AB jelölés esetén a FA2G2 és A2BG2 glikánok koelúciót mutattak, ProA alkalmazásával jól szétválaszthatók [73].

A HILIC-módszerhez tartozó mintaelőkészítés szintén jelentős fejlesztéseken ment keresztül. A korábban alkalmazott, időigényes vákuum-centrifugálási és HPLC-alapú tisztítási lépések helyett ma már gyors, nagy áteresztőképességű protokollok állnak rendelkezésre. Ezek egyesítik a specifikus enzimes (PNGase F) N-glikán felszabadítást, a fluoreszcens jelölést, valamint a szilárdfázisú extrakciót (SPE) [73-75]. A tisztítási lépés nélkülözhetetlen, mivel eltávolítja az N-glikán felszabadítása és jelölése után visszamaradt fehérjéket, sókat és felesleges jelölőmolekulákat, amelyek rontanák a mérés pontosságát, zavarhatnák a detektálást, vagy csúcseltolódást okoznának a kromatogramon. A hatékony tisztítás biztosítja a glikánok kvantitatív visszanyerését, és lehetővé teszi a glikán minták közvetlen injektálását HILIC-UPLC-FLR-MS rendszerbe.

A szabad glikánok izolálására több módszer áll rendelkezésre: SPE-alapú módszerek, mint 96-lyukú plate kialakítású készletek alkalmazása [76], illetve különböző kromatográfiás eljárások, például a funkciós csoporttal (pl. amin vagy amid) ellátott affinitás-kromatográfiás oszlopok alkalmazása [77]. Mivel ezek a módszerek a tisztítás előtti betöményítést igénylik, alkalmazásuk gyakran költséges

és időigényes. Ennek következtében egyre több kutatás irányul alternatív, glikán-specifikus izolálási technikák fejlesztésére [78]. Ilyen megközelítések közé tartozik például a hidrofíl interakción alapuló szűrőhegyek alkalmazása [79], a mágneses gyöngy-alapú [4], valamint az amin-funkcionalizált mágneses nanorészecskével történő tisztítás [78].

Összességében a HILIC-alapú fluoreszcens derivatizálással kombinált elválasztás nagy érzékenységet és izomerfelbontást biztosít. Ezt az analitikai módszert alkalmazom a kísérleteim során.

1.6. A mágneses nanorészecskék jellemzése és funkciói

A mágneses nanorészecskék (MNP) olyan nanoszkopikus méretű részecskék (általában 1-100 nm közötti átmérővel), amelyek ferri- vagy ferromágneses tulajdonsággal rendelkeznek, és jellemzően vas-oxid alapú anyagokból (magnetit vagy maghemit) állnak. Amikor a nanorészecskét külső mágneses térbe helyezzük, nettó mágneses momentum indukálódik benne. Ilyenkor a nanorészecske atomjai már nem véletlenszerűen orientálódnak, így az egyes atomok párhuzamosan rendeződnek a mágneses térrel és egy nem nulla eredő momentum eredményeznek. A mágneses anyagokban az atomok mágneses momentuma kis térfogatokba, úgynevezett doménekbe rendeződik. Nagyobb részecskék több domént tartalmaznak, amelyek egymás mágneses hatását részben kioltják. A részecskék méretének csökkenésével a többsdomén szerkezet egysdoménessé válik, ami energetikailag kedvezőbb, mert megszűnik a doménfalak energiája. További méretcsökkenéssel a hőmozgás képes az egész részecske mágneses momentumát megfordítani, így külső tér hiányában is a nettó mágneses momentum nulla marad. Ezt a jelenséget szuperparamágneses tulajdonságnak nevezzük [80, 81].

A nanorészecskék vizes közegben karboxil- vagy más ionizálódó csoportok révén, negatív felületi töltéssel rendelkeznek. Ez elektrosztatikusan taszítást eredményez a részecskék között, megakadályozva az aggregációt, és elősegítve a stabil,

homogén diszperzió kialakulását. Hidrofil természetük lehetővé teszi, hogy hidrogénkötéseken vagy dipól-dipól kölcsönhatásokon keresztül más hidrofil molekulákkal is kölcsönhatásba lépjenek. A nanorészecskék poláris jellege növeli a nedvesíthetőséget, - a vízmolekulák könnyen szétterülnek a nanorészecske felszínén - ami szintén hozzájárul a jó vízbeli diszpergálhatósághoz [82].

A különböző ferrit alapú nanorészecskéket gyakran vonják be biokompatibilis polimerekkel, például dextránnal, polivinil-alkohollal (PVA) vagy polietilén-glikollal (PEG). Ezek a bevonatok növelik a részecskék kolloid stabilitását, csökkentik és a biokompatibilitás növelése érdekében [83, 84].

1.6.1. Mágneses nanorészecskék orvosi alkalmazásai

A MNP-k az 1980-as évektől kezdve széles körben alkalmazást nyertek az orvostudomány számos területén. A diagnosztikai képalkotásban például az FDA (Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala) által engedélyezett vas-oxid-alapú nanorészecskéket használnak MRI kontrasztanyagként, illetve a képminőség javítására szolgáló anyagként (MPI-magnetic-particle imaging) is [85, 86]. A mágneses nanorészecskék egyik legnagyobb előnye a nagy fajlagos felület mellett az, hogy a felszínük szabadon és sokoldalúan módosítható. Különböző kémiai funkciós csoportokkal, (pl. hidroxil-, aldehid- vagy amin-csoport) kémiaiilag módosítva alkalmassá tehetők fehérjék, nukleinsavak, sejtek vagy cukrok szelektív izolálására komplex biológiai mintákból [87, 88]. Irodalmi példák között szerepel:

- genomi dezoxiribonukleinsav (DNS) izolálása növényi sejtekből [89],
- DNS kinyerése humán vérből vas-oxid alapú nanorészecskével [90],
- bakteriális plazmid DNS izolálás mangán-ferrit nanorészecskék segítségével [91],
- fehérje izolálásra [82],
- vérérszám eredetű glikánok megkötése mágneses gyöngy alapú technológiával [4, 78].

Az amin-funkcionalizált ferrit-alapú MNP-k kémiaileg variálható felülettel, gyors mágneses szeparálhatósággal és 96-lyukó plate-kompatibilitással ígéretesek lehetnek automatizálható glikán-tisztításra. Így a dolgozatban ezeket rendszerszerűen hasonlítom össze és optimalizálom.

2. Célkitűzések

A PhD disszertációmban bemutatott kutatás elsődleges célja, egy mágneses nanorészecskén alapuló, 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 mintázatát feltérképezsem. Mindez az alábbi pontok célkitűzéseit jelentette:

1. **Újonnan szintetizált amin-funkcionalizált MNP-alapú glikán tisztítási módszer fejlesztése:** Négyféle amin-funkcionalizált, ferrit-alapú nanorészecske tesztelése glikán-specifikus kötési képességük összehasonlításával UHPLC rendszeren. A négy különböző nanorészecske közül a legrobustusabb kiválasztása.
2. **MNP-platform optimalizálása automatizálhatóság szempontjából:**
A leghatékonyabb amin-funkcionalizált ferri-alapú MNP kiválasztása, majd annak glikán megkötés szempontjából történő optimalizálása. A diszperziós közeg, az MNP koncentráció és az elúciós pufferek tesztelése, majd a módszer integrálása egy automatizálható protokollba.
3. **A sclerosis multiplex betegségre jellemző nem szerint csoportosított minták N-glikozilációs mintázatának vizsgálata:** Teljes szérum alapú glikánprofil meghatározása az újonnan kifejlesztett MNP-alapú módszer alkalmazásával, megvizsgálva a női és férfi egészséges kontroll és Sclerosis Multiplex betegséggel diagnosztizált beteg mintacsoportok közötti eltéréseket.
4. **COVID-19 fertőzéssel kapcsolatos glikánprofilok elemzése vakcináltság hatására:** A fertőzésen átesett egyének teljes szérum N-glikánmintázatának vizsgálata, valamint a vakcináció hatásának elemzése az N-glikozilációs változásokra.
5. **Gyermekekori akut vakbélgyulladás diagnosztikai potenciáljának vizsgálata:** Laboratóriumi paraméterek és teljes szérum N-glikánmintázatok közötti korrelációk feltárása a diagnosztikai lehetőségek bővítése érdekében.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált anyagok

3.1.1. Amin-funkcionalizált ferrit alapú mágneses nanorészecskék előállításához

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

3.1.1. N-glikán mintaelőkészítéshez és LC-MS elemzéshez

- PNGase F enzim készlet (Asparia Glycomics, San Sebastián, Spanyolország)
- Borán-2-metilpiridin komplex (¹kat. szám: 654213), prokainamid-hidroklorid (kat. szám: P9879) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- DMSO (kat. szám: 85190) (Thermo Fisher Scientific, Kandel, Németország)
- Ecetsav ≥99%, LC-MS minősített (kat. szám: 84874.180), Formiát sav 99%, LC-MS minősített (kat. szám: 84865.180), Acetonitril ≥99.9%, HiPerSolv CHROMANORM® LC-MS minősített (kat. szám: 83640.320), 2-propanol ≥99.9%, HiPerSolv CHROMANORM®, LC-MS minősített (kat. szám: 84881.29) (VWR International, Leuven, Belgium)
- 25 (v/v)%-os Ammónia oldat (kat. szám: AM02580100), (Scharlab S.L., Barcelona, Spanyolország)
- humán szérum minták az aláírt vagy tájékoztatott beleegyezési nyilatkozat megléte mellett, a Helsinki Nyilatkozat előírásainak megfelelően kerültek gyűjtésre. A tanulmányt a Regionális Kutatásetikai Bizottság jóváhagyta (Etiikai engedély számok: sclerosis multiplex (RKEB/IKEB-G-102-102-2018),

¹ kat. szám: katalógus szám

COVID-19 (BORS-02-2021), gyermekkori akut vakbélgyulladás (BORS-02/2023) (Borsod-Abaúj-Zemplén Vármegyei Központi Kórház és Egyetemi Oktatókórház, Neurológiai, -Gyermekebészeti-és Infektológiai Osztályai, Miskolc, Magyarország)

3.2. Amin-funkcionalizált ferrit alapú mágneses nanorészecskék előállítás

A kísérleteimben négyféle amin-funkcionalizált ferrit alapú MNP-t állítottam elő a Miskolci Egyetem Anyag-és Vegyészmérnöki Kar Kémia Intézetben dolgozó Ilosvai Mária Ágnes PhD társammal. Az előállítási módszer egy koprecipitációs eljárás alapul, melynek lépéseit az alábbiakban ismertetem:

1. 50 ml etilén-glikolban feloldottam 8,08 g (2 mmol) vas(III)-nitrát nonahidrátot és a kívánt fémkomponens (kobalt (Co), nikkel (Ni), mangán (Mn) és magnézium (Mg)) kristályvizes formájával elegyítettem.
2. 12,3 g nátrium-acetátot oldottam 100 ml etilén-glikolban, amely 150 mmol mennyiségnek, azaz 1,5 M koncentrációnak felel meg. Az elkészítette oldatot fűtőkosárban, mágneses keverőt alkalmazva állandó keverés mellett, 100 °C-on, 15 percig kevertettem.
3. A feloldódott fémsók (Co,- Ni,- Mn,- Mg-fémsók) oldatát hozzáöntöttem a glikol-alapú nátrium-acetát oldathoz és további 30 percig kevertettem.
4. Az oldathoz 35 ml etanol-amint adtam és 200 °C-ra fűtve a rendszert 12 órán keresztül refluxáltattam a keveréket.
5. Lehűtöttem az oldatot, majd centrifugálással (4200 rpm, 10 perc) elválasztottam a fémsó-alapú szilárd fázist.
6. A visszanyert szilárd fázist különböző módon használtam fel a továbbiakban annak érdekében, hogy az MNP-re nézve eltérő kiindulási állapotú oldatokat hozzak létre (pl. szárított forma visszadiszpergálása Milli-Q vízben, glikolos oldat kimosása vízzel, majd annak hígítása):

6.1. A kinyert szilárd fázist desztillált vízzel néhányszor átmostam, amíg a mágneses ferrit könnyen el nem vált egy mágnes segítségével a vizes fázistól. Végül a kinyert mágneses ferritet átöblítettem abszolút etanollal és 70 °C-on, 12 órán keresztül szárítottam. A kísérleteim kezdetén tesztelt $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ és $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP típusok szárítással készültek. Az így kinyert $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-t az erre irányuló kísérletekben szárított MNP-nek (Sz jelölés) neveztem el. A szárítást követően meghatároztam az MNP tömegét, majd ezeket az értékeket alapul véve vízben 20 mg/ml koncentrációjú törzsoldatokat készítettem.

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

6.3. Az alábbi lépéseket szintén csak a $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP esetében végeztem el. A 12 órás refluxáltatást követően a glikolos közegből nem mostam ki az MNP-t, hanem azt, ebben az oldatban használtam a kísérletekben a további hígításokhoz. A felhasználás tesztelésénél glikolos MNP-nek (G jelölés) neveztem ezeket a mintákat. A glikolos oldatban diszpergált MNP koncentrációját nem tudtam közvetlenül meghatározni, mivel a magas forráspontú, erősen viszkózus oldószer nem távolítható el maradéktalanul a szilárd fázisról hagyományos szárítási módszerekkel.

Emiatt a kiindulási törzsoldat koncentrációját 100x-osnak tekintettem, és ebből különböző arányú hígításokat készítve vizsgáltam a glikán-specifikus kötés hatékonyságát (4.1. Eredmények alpontban ismertetem részletesen).

3.3. Az N-glikán-analízis mintaelőkészítési lépései

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

3.3.1. Szérumfehérjék és IgG denaturálása, glikánok enzimatis felzabátása

A 9 μl szérum mintát 65 °C-on, 15 percig denaturáltam 10 $\times$ hígítási koncentrációban alkalmazva az Asparia PNGase F készlethez tartozó denaturáló puffer hozzáadásával, így az emésztési közeg végtérfogata 10 μl volt. A denaturáció során a szérumban található fehérjék másodlagos és harmadlagos szerkezete felbomlik, ezáltal a glikán oldalláncok hozzáférhetővé válnak a következő lépésben alkalmazott enzim számára. Mivel ez a lépés magas hőmérsékleten, 65 °C-on történik, a reakciót követően körülbelül 10 percet vártam a minta szobahőmérsékletre való visszahűléséhez, hogy az enzimatis reakció optimális körülmények között meheszen végbe, az esetlegesen reakcióközegben maradt magas hő hatására az enzim ne degradálódjon. Ezt követően 20 μl térfogatra növeltem az emésztési közeget 7 μl Milli-Q víz és 2 μl 10 $\times$ PNGase F enzim puffer, végezetül pedig 1 μl PNGase F enzim hozzáadásával. Az összeállított elegyet 37 °C-on, egy éjszakán keresztül (O/N) hagytam inkubálódni.

3.3.2. Felszabadított glikánok fluoreszcens derivatizálása 300 mM ProA-val

Következő lépésként a cukrok jelölésére fluoreszcensen detektálható 2-ProA jelölőt készítettem, mely redukív aminálással kapcsolódik a glikánokhoz. A kutatócsoportunk korábbi tanulmányában összehasonlításra kerülő fluoreszcens jelölők közül (2-aminobenzamid, 2-antranilsav és 2-ProA) a 2-ProA biztosította a nagyobb retenciót és a jobb szeparációt a glikán analízise során HILIC-LC-MS rendszerben [63]. A 300 mM ProA jelölő oldat készítéséhez 300 mM prokainamid-HCl és 300 mM pikolin-borán szilárd anyagot oldottam fel 70/30 (v/v)% DMSO/ecetsav közegben, majd mintánként 10 µl jelölő oldat hozzáadásával 3,5 órán keresztül 65 °C-on inkubáltam fehérjékről lehasított glikánokat tartalmazó mintákat, a megfelelő fluoreszcens derivatizáció elérése érdekében.

3.3.3. N-glikánok tisztítási módszerei

Mivel a fluoreszcens festéket proporcionálisan feleslegben alkalmaztam a derivatizálás során így a glikán mintákat tisztítottam az analitikai mérések előtt. Emellett kiemelten fontos, hogy a tisztítási lépés során eltávolításra kerüljenek a szérumból visszamaradó fehérjekomponensek - beleértve a PNGase F enzimet is - valamint a pufferekből származó sók, mivel ezek jelenléte kedvezőtlenül befolyásolhatja mind a kromatográfiás elválasztás hatékonyságát, mind a tömegspektrometriás detektálás érzékenységét és pontosságát. A 300 mM koncentrációjú fluoreszcens jelölőoldattal történő derivatizációt követően a reakciót 170 µl 100 (v/v)%-os ACN hozzáadásával állítottam le, amivel a glikán minták végső térfogata 200 µl-re nőtt. Ezáltal a glikán minta környezete az acetonitrilre nézve 85 (v/v)%-sá vált, amely ideális polaritási közeget biztosít a tisztítás során a glikán adszorpció felületen való megkötés lépéséhez. A glikán tisztítási módszerekben alkalmazott pufferek és oldatok pontos elkészítésének receptjét az 1. számú melléklet 2. táblázata tartalmazza. A glikánok tisztítását két különböző, amin-funkciós csoporton alapuló módszerrel végeztem el.

A, N-glikán tisztítás amin-funkcionalizált mágneses nanorészecskékkel

A protokoll minden esetben azonos lépéseket végrehajtva került alkalmazásra, függetlenül attól, hogy az adott MNP-oldat milyen típusú ferrit-alapú mágneses nanorészecskét vagy diszpergáló közeget tartalmazott. A tisztítási lépések a következők voltak, amit grafikusán az 2. ábra mutat be.

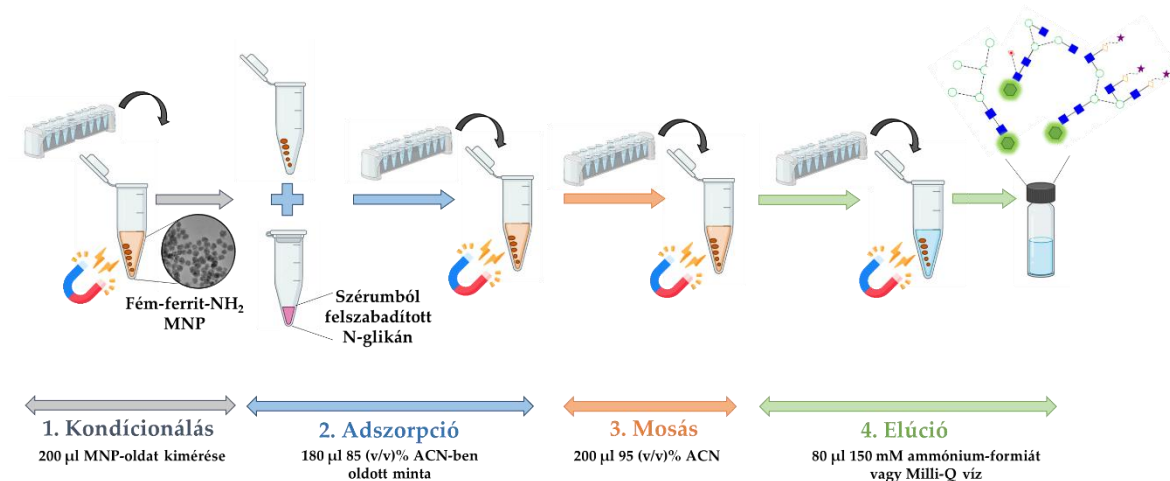
1. Kondicionálás: 1,5 ml-es Eppendorf-csövekben egységesen 200 μ l MNP-oldatot pipettáztam, majd mágneses állványra helyezve a csöveket, 1 perces inkubációs időt követően eltávolítottam a felülúszót.

2. Adszorpció: A glikán minták MNP felületén való megkötődéséhez, az emésztett és fluoreszcensen derivatizált minták felülúszóját (180 μ l 85 (v/v)% ACN oldott glikán minta) összeszuszpendáltam a 1,5 ml Eppendorf-csőben lévő mágneses nanorészecskével és 5 perc inkubációs időt követően ráhelyeztem a mágneses állványra. A mágneses állványon további 1 perces inkubációs időt tartottam, majd eltávolítottam a felülúszót és eltettem tiszta Eppendorf-csövekbe. Fontos megemlíteni, hogy a kísérletek során véletlenszerűen kiválasztottam három átfolyó frakciót, amelyeket UHPLC-HILIC rendszerben elemeztem annak érdekében, hogy megfigyelhető-e bennük glikánjel. A mérések alapján azonban glikánokra utaló jel nem volt kimutatható.

3. Mosás: A nanorészecskék felületéről aspecifikusan kötődő molekulák lemosására 200 μ l 95 (v/v)%-os ACN oldatot pipettáztam a nanorészecskékre. Az Eppendorf csöveket mágneses állványra helyeztem, majd 1 perces inkubációs idő letelével eltávolítottam a felülúszót.

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

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



3. ábra: Mágneses nanorészecskével történő glikán tisztítás folyamatábrája.

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

B, N-glikán tisztítás amid- és amin-funkcionalizált MonoSpin oszlopos készlet

Az amid- és amin-funkcionalizált MonoSpin oszlopos készletek (GL Sciences Inc., Tokió, Japán) egy forgalomban kapható egyenletes eloszlású szilícium-dioxid monolitos póruval ellátott, centrifugális oszlop, amire aminopropil egységen keresztül amid-vagy amin-funkciós csoportokat kapcsoltak. Ezt a kétfajta készletet alkalmaztam egyrészt a saját MNP-alapú glikán tisztítási protokoll összehasonlításához. Másrészt az amin-funkcionalizált oszlopos készletet a COVID-19 és az akut vakbélgyulladás teljes szérum N-glikozilációs vizsgálatában mintaelőkészítés során.

Az oszlop egy hidrofил-kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfiai eljárás (HILIC), mely alkalmas cukrok és más hidrofил vegyületek koncentráálásához. A funkciós-csoporttal ellátott MonoSpin oszlopos készletre épülő tisztítási folyamat

négy fő lépése szintén a kondicionálás, adszorpció, mosás és elúció. A MonoSpin oszlopot egy gyűjtő 1,5 ml Eppendorf-csőbe helyeztem, majd ezt alkalmaztam minden lépésnél, kivéve az elúciót, amihez tiszta 1,5 ml Eppendorf csövet készítettem elő. Az oszlopos glikán tisztítási módszer gyártói protokollt követve, az alábbi lépéseket tartalmazza, amit a 3. ábra grafikusan is bemutat:

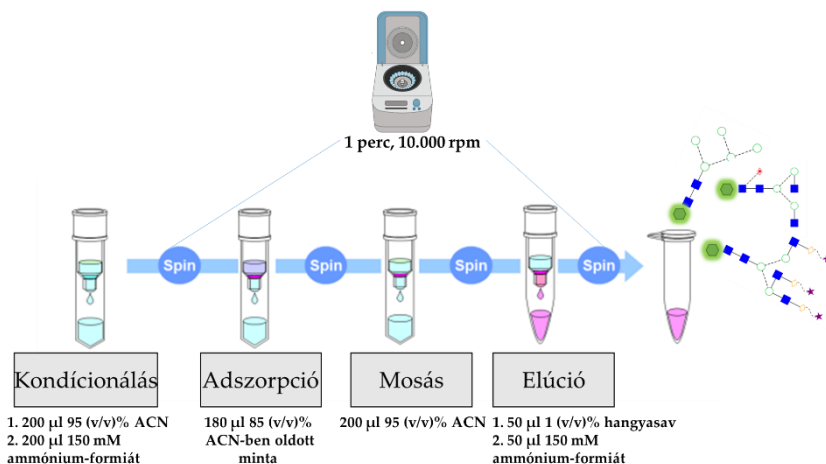
1. Kondicionálás: 200 μ l mosó puffert, ami 95 (v/v)%-os ACN oldat, mértem az amin-vagy amid-funkcionalizált MonoSpin oszlopra, majd centrifugáltam (1 perc, 10.000 rpm). Átfolyót kidobtam a gyűjtő Eppendorf-csőből. A kondicionálás második lépéseként 200 μ l elúciós pufferként alkalmazott 150 mM ammónium-formiát puffert mértem az oszlopra, majd centrifugáltam (1 perc, 10.000 rpm) és az átfolyót szintén kidobtam.

2. Adszorpció: A 180 μ l 85 (v/v)%-os ACN-ben oldott mintát az oszlopra mértem, majd 5 percig hagytam inkubálódni szobahőmérsékleten, hogy a glikánok megfelelően adszorbeáljanak az oszlopra kötött funkciós csoportokkal. Ezt követően centrifugáltam (1 perc, 10.000 rpm), majd az átfolyót eltettem egy tiszta Eppendorf-csőbe. Hasonlóan az 5.3.3. A alpontban leírtakhoz, itt is ellenőriztem kísérletenként három mintának az adszorpciót követő átfolyó glikán intenzitását, melyben nem találtam glikánból származó fluoreszcens jelet.

3. Mosás: 200 μ l mosó puffert (95 (v/v)%-os ACN) mértem az oszlopra, majd centrifugáltam (1 perc, 10.000 rpm) és eltávolítottam a felülúszót. Ezt követően az oszlopot tiszta 1,5 ml Eppendorf-csőbe helyeztem.

4. Elúció: A glikán molekulákat két lépésben eluáltam az NH_2 -funkcionalizált MonoSpin oszlopról. Először 50 μ l 1 (v/v)%-os hangyasav oldatot (elúciós puffer1) mértem az oszlopra, 3 percig inkubáltam, majd centrifugáltam. Második lépésben 50 μ l 150 mM ammónium-formiát puffert (elúciós puffer2) alkalmaztam, szintén az oszlopra pipettáztam, majd 3 percet hagytam inkubálódni, hogy a glikán molekulák teljesen deszorbeálódjanak az oszlopról. Ezt követően centrifugáltam (1 perc,

10.000 rpm), majd az átfolyót eluátumként eltettem a glikán HILIC-UHPLC-MS analízishez.



4. ábra: Amid- és amin-funkcionalizált MonoSpin oszlopos készlettel történő tisztítás lépései: a kereskedő oldalán megtalálható folyamatábra kiegészítésével.

1. Kondicionálás: MonoSpin oszlop aktiválása a tisztítás során alkalmazott mosó és elúciós pufferekkel, 2. Adszorpció: glikán minta adszorpciója az funkciós-csoporttal ellátott oszlop felületén az amid vagy-amin funkciós csoportokon keresztül, 3. Mosás: 85 (v/v)%-os ACN oldattal történő aspecifikus molekulák eltávolítása, 4. Elúció: glikánok deszorpciója az NH_2 -oszlopról 1 (v/v)%-os hangyasav -és 150 mM ammónium-formiát pufferek alkalmazásával.

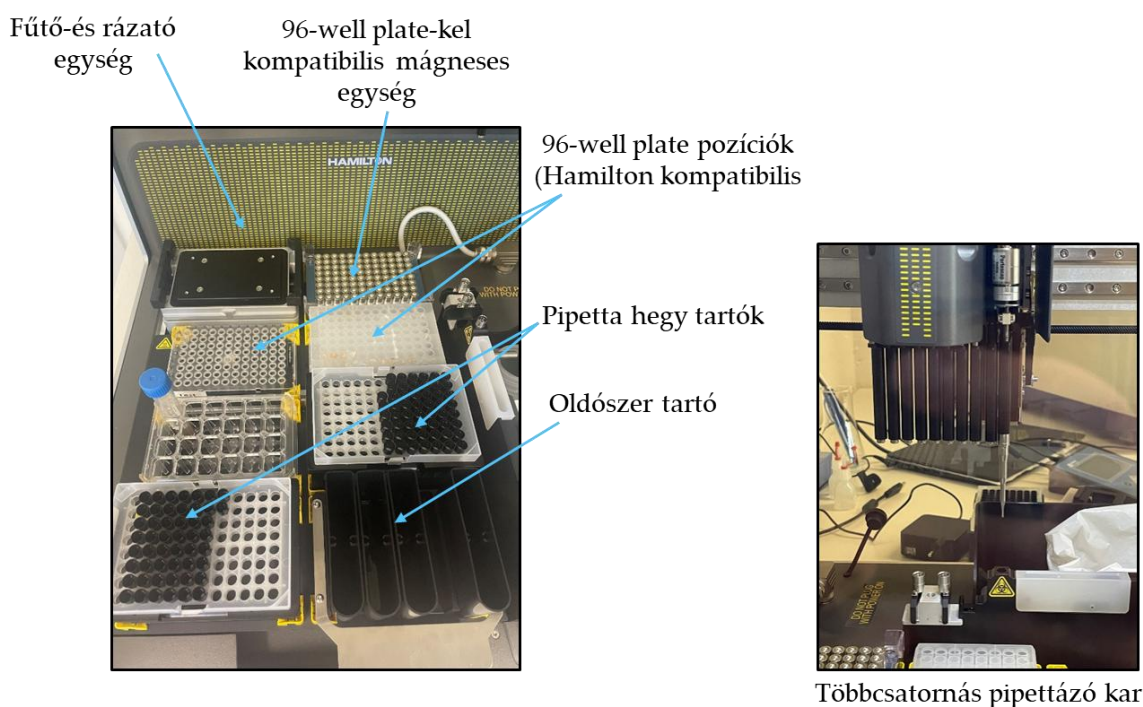
3.3.4. A glikán-tisztítási protokoll automatizálása

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

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

- Elúciós puffer (150 mM ammónium-formiát, pH 4,4).

A manuálisan kifejlesztett protokoll lépéseit a Hamilton vezérlőszoftverbe importáltam, és kisebb módosítással illesztettem a robot kapacitásához. A legfontosabb változtatás a MNP-oldat térfogatának 200 μ l-ről 180 μ l-re való csökkentése volt, mivel a 96-lyukú plate maximális végtérfogata 200 μ l. Ez a változtatás biztosította a megbízható pipettázást és elkerülte a túlsordulásból eredő hibákat. Az automatizált folyamat lépéseit a 1. számú melléklet 3. táblázata tartalmazza, amely a Hamilton vezérlő szoftverbe betöltött lépések sorrendjét is bemutatja.



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

3.4. N-glikán analízis UHPLC-MS rendszerekben

3.4.1. Alkalmazott Waters UHPLC-MS készülékek

Az N-glikán mintákat Waters Acquity UHPLC rendszerrel mértem le mind az MNP alapú glikán-tisztítási protokoll fejlesztésére irányuló kísérletek során, mind a Sclerosis Multiplex és COVID-19 betegségekhez kapcsolódó teljes szérum N-glikozilációs profiljának feltérképezésekor. A Waters Acquity UHPLC készülék

fluoreszcens detektorral és egy Waters SQD típusú tömegspektrométerrel van felszerelve (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA). A Waters SQD egy egyszektoros kvadrupól tömegspektrométer, amely lehetővé teszi a kromatográfián elválasztott vegyületek gyors és érzékeny tömegspektrum-alapú detektálását, kiegészítve a fluoreszcens jel detektálását szerkezeti információval. A rendszert az Empower 3 kromatográfiás szoftver vezérelte, amely egy megbízható, moduláris és felhasználóbarát platform a Waters berendezések adatgyűjtésére és feldolgozására. Az Empower 3 képes egyszerre több detektor (pl. UV, FLR, MS) szinkronizált vezérlésére és adatainak összehangolt kiértékelésére, ami különösen hasznos komplex glikánprofilok elemzésekor.

A gyermekkori akut vakbélgyulladás mintaszett, egy Waters Acquity H-class UHPLC készüléken került elemzésre, amely szintén fluoreszcens detektorral van kapcsolva. Továbbá a folyadékkromatográfiás rendszer Waters Xevo-G2-XS QToF (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) tömegspektrométerrel van összekötve. A QToF detektor nagyobb tömegpontosságot, felbontást és szelektivitást biztosít, így pontosabb molekulaazonosítást tesz lehetővé – különösen fontos ez a komplex glikán keverékek esetén, ahol több izomer vagy azonos tömegű, de eltérő szerkezetű komponens fordulhat elő. A rendszert a MassLynx 4.2. verziójú kromatográfiás vezérlőszoftver (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) működteti, amely a Waters QToF és ToF eszközök natív vezérlőszoftvere. A MassLynx lehetővé teszi az LC és MS komponensek részletes beállítását (pl. gradiens program, detektorfeszültségek, ionforrás paraméterek), valós idejű adatgyűjtést és monitorozást, valamint az egyes MS-adatok nyers formátumban (RAW) történő mentését, melyeket később különböző adatfeldolgozó szoftverek képesek kezelni. A méréseket követően az adatok kiértékelését UNIFI szoftverrel (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) végeztem, amely egy integrált adatelemző platform, kifejezetten biomolekulák, például glikánok, peptidok és kis molekulák automatizált analízisére fejlesztve. Az UNIFI lehetőséget nyújt a fluoreszcens kromatogramok automatikusan integrálására, azaz kiszámítja a csúcsterületeket és retenciósidőket,

továbbá a tömegspektrumokat m/z értékek alapján automatikusan összeveti egy előre definiált glikán adatbázissal, és elvégzi a glikánstruktúrák azonosítását. Fontos kiemelni, hogy az LC és MS jeleket együttesen értelmezi, így egyértelmű kapcsolat hozható létre a fluoreszcens csúcs és a tömegspektrumban detektált ionok között. Az UNIFI szoftverrel végzett adatfeldolgozás során a vakbélgyulladás mintaszett esetében automatizáltan történt mind a fluoreszcens kromatogramok integrálása, mind a glikánstruktúrák m/z alapú azonosítása. Ez jelentősen csökkentette a kézi adatfeldolgozási időt, és nagyobb reprodukálhatóságot tett lehetővé.

3.4.2. Kromatográfiás beállítások és mérési körülmények

Az elválasztásokat Waters BEH Glycan Amid típusú oszlopon végeztem (100 x 2,1 mm (100 mm: oszlop hossza, 2,1 mm: oszlop belső átmérője), 1,7 μm részecskeméretű töltet), lineáris gradiens alkalmazásával, amely 72-55 (v/v)%-os B puffert (100 (v/v)%-os ACN) jelentett 0,4 ml/perc áramlási sebességgel, 42 percen keresztül. A kromatográfiás elválasztáshoz A pufferként 50 mM ammóniumformiát (pH 4,4) puffert alkalmaztam, aminek elkészítését az 1. számú melléklet 2. táblázata tartalmazza. A BEH Glycan Amid oszlop egy, a Waters által fejlesztett hídképzett etil-hibrid, azaz szilícium-szerves hibrid szerkezettel (BEH) kialakított oszlop. A BEH technológia a hagyományos szilícium-dioxid alapú HPLC oszlopok fejlesztett változata. A szilika szemcsék szerkezetébe etil-csoportokat építenek be, amelyek „hidakat” képeznek, így az oszlopban lévő részecskék poláros, hidrofил vegyületek elválasztására kiválóan alkalmazható. A gradiensmódszer célja, hogy megfelelően elkülönítse az eltérő polaritású glikánszerkezeteket; a magas kezdő acetonitril-tartalom segíti a hidrofил kölcsönhatáson alapuló retenciót, míg a gradiens során fokozatosan növekvő vizes fázis a hidrofилlebb glikánstruktúrák eluálását teszi lehetővé, mivel csökkenti azok interakcióját az állófázison található amid csoportokkal. A 0,4 ml/perc áramlási sebesség az oszlop méretéhez és a tömegspektrométer ionizációs feltételeihez is jól illeszkedik, így optimalizálva a csúcsszélességet

és a detektálási érzékenységet. A mintákat 75/25 (v/v)%-os ACN és Milli-Q víz oldatában oldottam fel, ami biztosítja a glikánok hatékony retencióját az oszlopon. Minden mérés során 5 μ l-t injektáltam, amely optimális térfogatnak bizonyult, elkerülve a csúcsok szélesedését és oszlop mintával való túlterhelését. A mintaadagoló hőmérsékletének az általánosan használt 15 °C-t, míg az oszlop hőmérsékletének 60 °C-t állítottam be minden elemzés során. A magasabb oszlophőmérséklet csökkenti a mozgófázis viszkozitását, javítva az elválasztás hatékonyságát és reprodukálhatóságát, mindamellett, hogy nem roncsolja a glikán molekuláris szerkezetét. A fluoreszcens detektor gerjesztési és emissziós hullámhosszai 309 nm és 359 nm voltak. A prokainamid fluoreszcens jelölőként való alkalmazása során a molekula gerjesztési maximuma 309 nm-nél, míg emissziós maximuma 359 nm-nél figyelhető meg. Ennek megfelelően a prokainamiddal derivatizált glikánok ezen a hullámhossz-páron nagy érzékenységgel és specifikusan detektálhatók. Az MS-analízis során a kapillárisra 2,2 kV elektropray feszültséget alkalmaztam, mivel ez az érték elegendő a stabil és hatékony ionizációhoz anélkül, hogy túlzott fragmentációt vagy ionelnyomást okozna. Ez a feszültségtartomány továbbá alkalmas volt a pozitív ionizációs módban történő analizáláshoz, amit 500-2000 m/z tartományban végeztem, adatfüggetlen akvizíciós módban. A deszolvatációs hőmérséklet 120 °C-ra volt beállítva, míg a deszolvatációs gáz áramlási sebessége 500 l/h volt. Ezeket a paramétereket alapbeállításként alkalmaztam a glikán molekulák tömegspektrometriás méréséhez, mivel a viszonylag alacsonyabb hőmérséklet hozzájárul az érzékeny, hőre labilis glikánok integritásának megőrzéséhez, míg a nagy gázáramlás elősegíti a cseppek gyors párologtatását, javítva az ionképződés hatékonyságát és a tömegspektrometriás jel tisztaságát.

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

Waters Acquity UHPLC

Oszlop típus	Waters Glycan BEH Amid (100/150 x 2,1 mm belső átmérő (i.d.), 1,7 µm részecskeméret)
A puffer	50 mM ammónium-formiát oldat (pH 4,4)
B puffer	100 (v/v)% ACN
Áramlási sebesség	0,4 ml/perc
Gradiens	72-55 (v/v)% az A pufferre nézve
Erős mosó puffer / Gyenge mosó puffer	20 (v/v)% ACN / 80 (v/v)% ACN
Injektálási mód	PLNO (részhurkos injektálás túltöltéssel)
Injektálási térfogat	5 µl
Oszlop hőmérséklet	60 °C
Exitációs / emissziós hullámhossz	$\lambda_{\text{ex}} = 309 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 359 \text{ nm}$
Waters SQD és Xevo-G2-XS QToF tömegspektrométerek	
Ionizációs mód	pozitív
m/z tartomány	500-2000 m/z
Elektrospray feszültség	2,2 kV
Deszolvatációs hőmérséklet	120 °C
Gázáram	800 l/óra

3.5. Kiértékeléshez alkalmazott szoftverek és statisztikai tesztek

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

3.5.1. IBM SPSS Statistics 25

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

Normalitásvizsgálat

Az IBM SPSS szoftverben Shapiro–Wilk normalitásvizsgálatokat alkalmaztam, mivel a mintacsoportokon belüli mintaszám minden kísérletben kisebb volt, mint 50. A Shapiro-Wilk teszt nullhipotézise, hogy a minták követik a normál eloszlást, így az alacsony $p < 0,05$ értékek a nem-normális eloszlást jelentik. A teszt jellemzője még az adatok szimmetriájára és csúcsosságára való érzékenység.

Szignifikáns különbségek keresése

Mivel az adataim nem követték a normál eloszlást, így a mintacsoportok közötti szignifikáns eltérések azonosítására Mann-Whitney U-tesztet (csak a Sclerosis Multiplexre irányuló kísérletsorozatban, 2 mintacsoport - a beteg és kontroll csoportok - összehasonlítására) és Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztam, mely megfelelő a 2-nél több mintacsoportok közötti adatok összehasonlításra. A Kruskal-Wallis teszt alkalmazásánál a teszteket először 0,05 majd 0,01 szignifikancia szintek (p -értékek) beállításával is elvégeztem, ezzel szigorítva a többszörös tesztelés hibalehetőségeit. A teszt elvégzésével a mintacsoportok közötti különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettem, ha a $p < 0,05$. A szignifikancia erőssége szerint az eredményeket $^*(p \leq 0,05)$, $^{**}(p \leq 0,01)$ vagy $^{***}(p \leq 0,001)$ jelöltem.

ROC görbe

A Karakterisztikus Görbe Analízis vagy röviden ROC (Receiver Operating Characteristic) analízist döntéshozó rendszerként alkalmaztam, hogy behatárolja az

egyes N-glikán struktúrákat a CAT% értékek, mint változókat az adott mintacsoporthoz (pl. beteg vagy kontroll) való tartozás alapján, mint döntési kimenetelhez. Azáltal, hogy a teszt adatainak érzékenységet és specifitását egyaránt értékeljük, a teszt megmutatja a hibázás mértékét is. A ROC görbén az y tengelyen bemutatott érzékenység (szenzitivitás) reflektálja a valódi pozitív értékek arányát (TPR), azaz a helyesen azonosított pozitív értékeket. Minél magasabb a TPR aránya, annál megbízhatóbban jellemzi az adott változó a mintacsoportot. Az x tengely mutatja a hamis pozitív értékek arányát (FPR) vagy 1-specifitás értékeket, ami minél alacsonyabb annál kisebb a hibázás mértéke. A ROC görbe minden pontja egy adott döntési küszöbértéknek az érzékenység/1-specifitás párosát jelenti [92]. A ROC görbe analízishez a szoftver automatikusan 95%-os szignifikancia szintet állít be, amin nem változtattam. A konfidencia intervallum megadja azt a tartományt, amelyen belül 95%-os valószínűséggel található a valódi görbe alatti terület (AUC) érték, ha sokszor megismételnénk a vizsgálatot hasonló körülmények között. Minél magasabb az AUC értéke annál megbízhatóbb a teszt. A tesztsben adott aszimptotikus szignifikancia megerősíti, hogy az adott marker valóban képes megkülönböztetni a pozitív és negatív eseteket, tehát ha szignifikáns az eredmény, akkor nem véletlenül jött létre. Valamint az elemzés eredményeként az aszimptotikus alsó-és felső határ közötti tartomány figyelembevételével lehet következtetni a becslés pontosságára és bizonytalanságára. Ha az alsó határ meghaladja a 0,5 értéket, akkor a teszt pontossága elfogadható.

3.5.2. Past 4.02.

A Past („Paleontological Statistics Software” csomag) 4.02-es verzióját (Oslói Egyetem, Norvégia) alkalmaztam Lineáris Diszkrimináns Analízis (LDA) elvégzésére és ábrázolására. Az LDA egy olyan statisztikai módszer, amely a bemeneti változók – jelen esetben az N-glikánok CAT%-os értékei - olyan lineáris kombinációját úgynevezett diszkriminancia függvényeket határoz meg, amelyek mentén, az

előre definiált csoportok elkülönülése a lehető legnagyobb mértékű. A módszer során meghatározott diszkriminancia függvények mindegyikéhez tartozik egy sajátérték (eigenvektor), amely megmutatja, hogy az adott lineáris kombináció mekkora arányban járul hozzá az adathalmaz teljes szórásához, vagyis az adatok varianciájához. A sajátértékek arányából számítható az úgynevezett összvariancia megoszlása, amelyet százalékos formában értelmezünk. Például egy 84,80%-os hozzájárulás azt jelzi, hogy a vizsgált elválás döntő többsége már az első tengely mentén megmagyarázható. A diszkriminancia függvények mentén ábrázolt minták és változók két- vagy háromdimenziós térben való szemléltetésére szolgál a biplot, amely egy kombinált pont- és vektorábra. A minták (pl. betegek, kontrollok) pontként, míg a változók (pl. egyes glikánstruktúrák) vektorként jelennek meg a tengelyek által meghatározott koordinátarendszerben. A vektorok iránya és hossza információt ad arról, hogy az adott változó milyen mértékben és milyen irányba járul hozzá a minták elválasztásához.

3.5.3. GraphPad Prism 10.1.2.

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

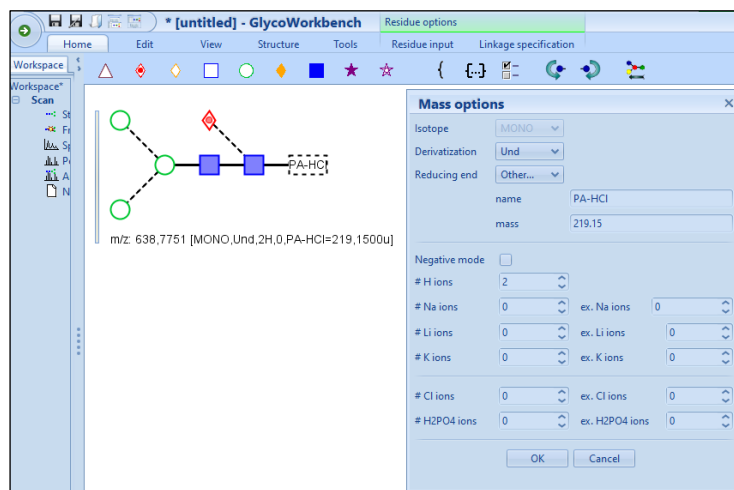
3.5.4. Python 3.10.0

A gyermekkori akut vakbélgyulladás vizsgálatára irányuló kísérlet eredményeinek kiértékeléséhez és bemutatásához Python programozási nyelvet alkalmaztam (Python Software Foundation (PSF), Delaware, USA). A szoftverben folytonos változók normalitásának vizsgálatára Shapiro–Wilk tesztet (95%-os konfidencia-

szinten) használtam. Továbbá Spearman- és Point-Biserial korrelációanalízist végeztem, melynek eredményét hő térképen ábrázoltam, ahol az egyes glikáncsúcsok vakbélgyulladás betegségre gyakorolt hatását pontozási rendszerben mutatom be: például 7-nél nagyobb korrelációs együttható értéket erős korrelációnak tekintettem. A paraméterpárok korrelációs együtthatóinak értelmezése 10^{-1} -es skálán történt. A Python szoftvert vizuális ábrázolásra is használtam, mivel a Kruskal–Wallis próbával szignifikáns eltérést mutató N-glikán csúcsokat a szoftverben létrehozott pontdiagramok segítségével szemléltettem, ahol a betegség jelenléte vagy hiánya függő változóként került beállításra az esetleges mintázatok szemléltetése céljából.

3.5.5. GlycoWorkBench 2.1.

A glikánok tömegspektrometriás (MS) analízise során a szerkezetek azonosítása gyakran manuális, időigényes lépésekből áll. Ennek támogatására jött létre a GlycoWorkbench nevű szoftver, amely összeveti az elméleti tömegeket a spektrumból nyert csúcsokkal, és vizuálisan segíti a legvalószínűbb szerkezeti megfelelések kiválasztását. A szoftver ingyenesen elérhető eszköz, ami segítségével glikánszerkezeteket az azonosított tömegük alapján, a kötések és monoszacharid egységek szerint tudjuk grafikusán ábrázolni [25].



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

3.6. SARS-CoV-2 ELISA immunoassay vizsgálat

A szérumminták SARS-CoV-2 ellen termelődött IgG szintjét ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay vagy enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat) módszerrel ellenőriztem. A kísérletben alkalmazott mikrolemez alapú SARS-CoV-2 IgG ELISA készlet, szérum vagy plazma eredetű SARS-CoV-2 IgG antitestek in vitro kvalitatív detektálására alkalmas (Autobio Diagnostics CO., LTD., Kína). A módszertípust tekintve ez a készlet kemilumineszcens módon kimutatható két-lépéses indirekt elven működik. Első lépésben a mintát és a minta oldatot, a SARS-CoV-2 antigénnel borított mikro zsebes lemezben összesuszpendáltam. Majd a mosási lépéseket követően HRP-konjugátum került hozzáadásra, ami a mintában található SARS-CoV-2 IgG antitesttel komplexet alkot egy immunológiai reakción keresztül. Ezt követően kemilumineszcens szubsztrátumot adtam a közeghez, amit a komplex katalizál egy kemilumineszcens reakcióban. Ennek eredményeként a közegben abszorbanciát tudunk mérni, ami arányos lesz a mintában lévő SARS-CoV-2 IgG mennyiségével. A reakció összeállítását a protokollban leírtak alapján végeztem el a gyártói utasítások szerint. A kemilumineszcens detektálást 450 nm-en végeztem egy lemezolvasó berendezés használatával (ClarioStar lemez olvasó berendezés; BMG LabTech, Ortenberg, Németország). Az eredmények értékeléséhez a készlethez kapott pozitív standard kontroll minta OD₄₅₀ értéken mért abszorbancia értéke alapján határoztam meg a reakció küszöbértékét. Ez a pozitív kontroll átlagos abszorbanciájának (OD₄₅₀) a 15%-a volt. Így a tesztben a reaktív vagy pozitív eredmény azt jelenti, hogy a minta abszorbanciája eléri vagy meghaladja a 0,1-et (OD₄₅₀ ≥ 0,1). Ezzel szemben a nem-reaktív vagy negatív eredmény azt jelenti, hogy a minta abszorbanciája 0,1 alatti. (OD₄₅₀ < 0,1).

4. Eredmények

Az eredményeket két fő részre bontottam, mivel a kutatás során az MNP-alapú protokoll optimalizálása és a teljes szérum N-glikozilációs vizsgálatok időben párhuzamosan zajlottak. Emiatt az optimalizált MNP-módszer nagy mintaszámú alkalmazására csak a Sclerosis Multiplexhez kapcsolódó glikozilációs elemzések során került sor. A 4.1. részben az amin-funkcionalizált mágneses nanorészecske alapú glikán tisztítási protokoll optimalizálási folyamatának eredményeiről, az optimalizálási lépéseket alpontokra bontva számolok be. Továbbá a 4.2. alpontban a teljes szérum N-glikozilációs feltérképezésének eredményeit ismertetem az általam tanulmányozott háromféle gyulladásos betegségben megfigyelt N-glikozilációs változások bemutatásával.

A kísérletekben konzisztensen az N-glikozilációs vizsgálatok során a minta-előkészítést az N-glikánok felszabadításával kezdtem, amelyet az N-glikán specifikus PNGase F enzimatis emésztése révén valósítottam meg. Ezt követően a felszabadított glikánokat 2-ProA alapú fluoreszcens jelöléssel derivatizáltam. Az analitikai mérés előtt a glikánokat különböző, hidrofíli interakción alapuló tisztítási módszerekkel tisztítottam, ideértve a korábban bemutatott, amin-funkcionalizált centrifugális oszlopot, valamint az újonnan kidolgozott, amin-funkcionalizált $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (Sz) típusú mágneses nanorészecske alapú protokollt. Az N-glikán analízist HILIC-UHPLC-MS rendszeren végeztem el, a 3.4. alpontban részletesen bemutatott módszertan alapján.

4.1. Amin-funkcionalizált MNP-k: összehasonlítás, optimalizálás, automatizálás N-glikánokhoz

Az amin-funkcionalizált MNP protokoll optimalizálását és automatizálását az alábbi lépéseket követve végeztem:

- különböző ferrit-prekurzorok hatása az MNP-k N-glikánmegkötő képességére,

- diszperziós közeg és az MNP-koncentráció hatása a részecskék stabilitására és a megkötés hatékonyságára,
- elúciós puffer összetételének szerepe a glikánok kötődési mechanizmusában,
- fejlesztett MNP-alapú protokoll összevethetősége kereskedelmi forgalomban elérhető amin-funkcionalizált centrifugális oszlopokkal,
- MNP-alapú protokoll automatizálása szérumban N-glikánok megkötésére

A 4.1. alpontban leírt optimalizálási összehasonlításhoz a kromatogramok Empower 3 kromatográfiás szoftverben történő integrálásából származó paramétereket vettem figyelembe:

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

4.1.1. A különböző ferrit prekursorok hatása az N-glikánok megkötési hatékonyságára

A kísérlet során Co-, Mg-, Mn- és Ni-prekursor felhasználásával koprecipitációs módszerrel előállított, amin-funkcionalizált, ferrit alapú MNP-ket hasonlítottam össze N-glikán megkötési hatékonyság és szabad festék (SZFF) eltávolítás szempontjából. Az SZFF a kromatogram elején megjelenő, jellemzően nagy intenzi-

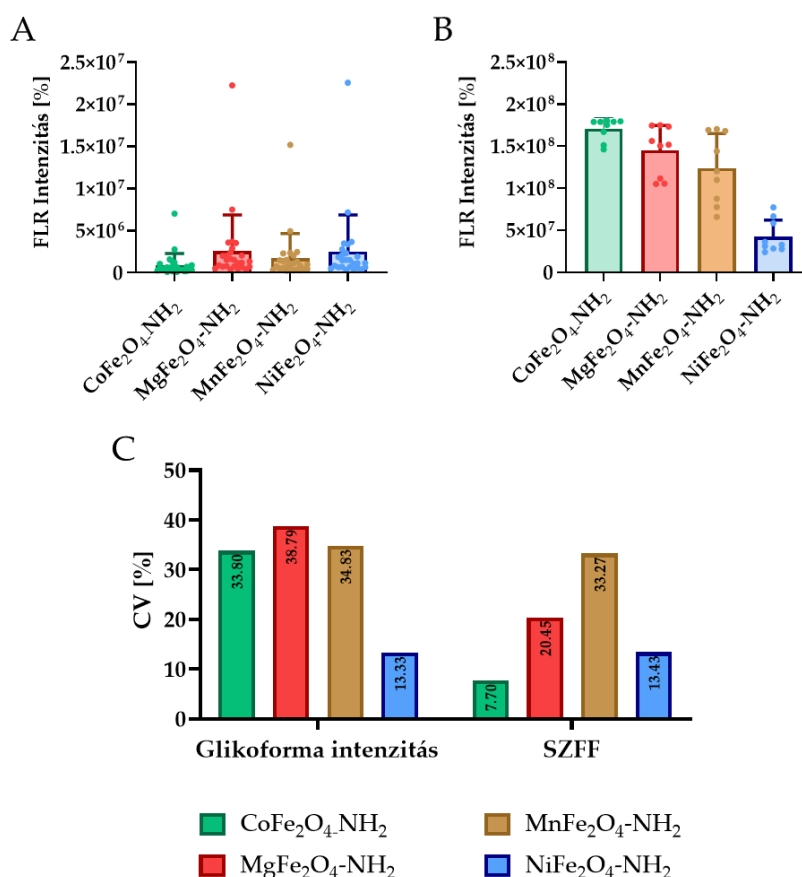
tású csúcs, és a visszamaradt szabad fluoreszcens festék jelenlétére utal. Az alacsony SZFF-csúcsintenzitás a szennyező komponensek hatékonyabb eltávolítását jelenti, így az optimálisabb tisztítási körülményt jellemzi. A magas glikáncsúcs és alacsony SZFF-csúcs intenzitás együttesen jellemezték a különböző típusú MNP-k glikán-specifikus kötési teljesítményét.

Az MNP-ket különböző karakterizációs módszerekkel jellemeztük, melyek eredményét az 1. számú melléklet ábrái és táblázatai tartalmazzák. A részecskék méretét és morfológiáját transzmissziós elektron mikroszkóp (TEM) felvételek mutatják. Az MNP kristályszerkezetet röntgendiffrakciós (XRD) mérésekkel, míg felszíni funkciócsoportjaikat Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiával (FTIR, CHNS) igazoltuk.

A négyféle ferrit alapú részecskét $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$, $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ és $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP elnevezéssel jelöltem. A szintézist követően a különböző MNP-k kiszáritásra kerültek, majd 50 ml 5 mg/ml MNP koncentrációjú diszperziót készítettem, úgy, hogy 250 mg szárított MNP-t diszpergáltattam 50 ml Milli-Q vízben. A glikán megkötés hatékonyságára egészséges humán szérumként gyűjtött mintát alkalmaztam, ami minden MNP-protokoll fejlesztési kísérlethez egységesen került alkalmazásra. A glikán tisztítási eljárás optimalizálását három-három párhuzamos mintán végeztem. Az 5 mg/ml koncentrációjú oldatokból 200-200 μl -t használtam egy-egy minta tisztításához. Minden egyes minta esetében háromszori UHPLC injektálást alkalmaztam a módszer reprodukálhatóságának alátámasztása érdekében. Ennek megfelelően mind a négy protokoll esetében 9-9 kromatogram került rögzítésre, amelyek mindegyikén 26 különböző glikoformot és egy SZFF csúcsot határoztam meg.

Az négyféle amin-funkcionalizált MNP-protokollokhoz tartozó összesített glikán intenzitás átlag és szórás értékek a 7. ábra A alábrán kerültek bemutatásra, míg az SZFF intenzitását a B diagram szemlélteti. A mérésekből származó nyers adatok az 1. számú melléklet 3. táblázatában találhatók. Mivel a kromatogramokon 26 különböző, eltérő méretű és intenzitású glikáncsúcs került meghatározásra, az

ezekből számított együttes átlagintenzitásokhoz tartozó szórásértékek magasnak bizonyultak. A nagy szórásértékek hatásának kiküszöbölésére relatív szórást, azaz a variációs koefficiens (CV) számoltam egyenként a 26 integrálással meghatározott glikánok esetében, valamint az SZFF párhuzamos mintáinak méréseiből is összesített átlagot, szórást és CV-t számoltam, amit szintén 7. ábra C aldiagram mutat be. A CV értékek értelmezése szempontjából fontos kiemelni, hogy minél alacsonyabb a CV, annál kisebb a mérési szórás az átlaghoz képest, azaz annál jobb a mérési pontosság és reprodukálhatóság. A kapott eredmények alapján a $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ típusú MNP esetében az összesített glikoformák intenzitásának CV értéke mutatta a legalacsonyabb értéket 13,33%, amely a szakirodalmi adatok elfogadhatónak tekinthető homogén mintaeloszlás és megfelelő reprodukálhatóság esetén (7. ábra C). Mivel jelen esetben az alacsony SZFF intenzitás elérése volt a cél, egyidejűleg nemcsak az alacsony átlagérték, hanem a hozzá tartozó alacsony CV is fontos szempont. A $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ típusú MNP esetében a legalacsonyabb átlagos SZFF-intenzitás értéket kaptam ($\sim 5 \times 10^7$ EU), amihez 13,43% CV érték társult.



7. ábra: Az amin-funkcionalizált mágneses nanorészecskék (MNP) négy különböző típusának glikánok tisztítására való alkalmasságának értékelése a glikáncsúcs- és SZFF FLR intenzitás értékei alapján. (A) Összesített FLR glikán intenzitás MNP típusok szerint, medián alapján (B) SZFF FLR intenzitás MNP típusok szerint (C) A glikoformák és SZFF párhuzamos mintákra vonatkozó CV-értékek. Az oszlopdiagramok az egyes glikoformák relatív szórását (CV [%]) mutatják, melyek pontos értékei láthatók.

A különböző típusú mágneses nanorészecskék glikánmegkötési hatékonyságának vizsgálata alapján a $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ típusú MNP dta a legmagasabb össz-intenzitást és a legalacsonyabb SZFF-intenzitást. Következésképp a $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ került kiválasztásra további optimalizálásra. A vizsgálatok során elemeztem a diszperziós közeg típusának, valamint a nanorészecske-koncentrációnak a glikántisztítás hatékonyságára gyakorolt hatását, mert a szárított MNP típus gyors ülepedése pipettázási bizonytalanságot okozott.

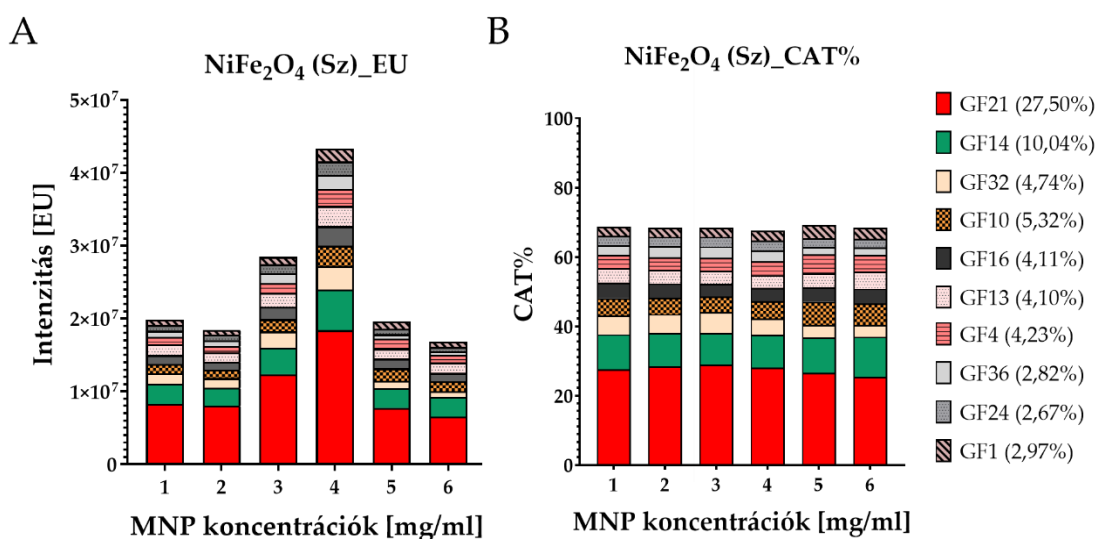
4.1.2. Szárított, glikolos és vizes diszperziós közegek optimalizálása különböző koncentrációk függvényében

A $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP protokoll optimalizálásánál azt vizsgáltam, hogy a különböző diszperziós közegek (szárított - Sz, glikolos - G, vizes - V) és koncentrációk hogyan befolyásolják a glikánmegkötés hatékonyságát. A koncentrációk hatásán túl a cél a szedimentációs problémák csökkentése és a protokoll reprodukálhatóságának javítása volt. A problémát a szintézist követő kiindulási diszperzió minőségében láttam. Így a szintézist követően előállított $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-t a glikolos szintézis közegében hagytam, ami a $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (G) elnevezést kapta (Anyagok és módszerek 3.2. alpont 6.3. lépése alapján előkészítve). Továbbá teszteltem a $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-t úgy is, hogy részecskéket nem szárítottam ki, hanem a vizes mosásokat követően vizes közegben hagytam, amit $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (V) MNP-nek neveztem (Anyagok és módszerek 3.2. alpont 6.2. lépésében ismertettem).

Mindhárom közeg esetében koncentráció sorokat állítottam be, majd UHPLC-FLR analízissel a 10 legabundánsabb glikoforma intenzitását és CAT% értékeit hasonlítottam össze. Az értékelésnél az intenzitás a tisztítás hatékonyságát, míg a CAT% a reprodukálhatóságot jelezte.

NiFe₂O₄-NH₂ (Sz) MNP optimalizálása különböző koncentrációk függvényében:

Ebben az alponban a korábban leghatékonyabbnak megállapított NiFe₂O₄-NH₂ (Sz) MNP típusnak a 16 mg/ml, 8 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml és 0,5 mg/ml koncentrációt vizsgáltam. A 8. ábra oszlopdiagramjain megfigyelhető, hogy az összesített intenzitás a 4 mg/ml MNP koncentráció esetében volt a legmagasabb. Az ezt meghaladó koncentrációk esetében a kromatogramokon detektált cukormolekulák intenzitása az MNP koncentrációnövelés esetében már nem eredményezett további tisztítási hatékonyságnövekedést (8. ábra A). Mivel az egyes glikformák CAT% értékei között nem volt szignifikáns eltérés (ANOVA teszt alapján), az adatok összehasonlíthatónak tekinthetők (8. ábra B). Ennek alapján megállapítható, hogy a deglikozilált szuszpenzióban jelenlévő glikánok mennyisége a ~4 mg/ml koncentrációjú NiFe₂O₄-NH₂ (Sz) MNP kapacitásának felel meg.



8. ábra: Glikán tisztítás különböző koncentrációjú: 16 mg/ml-1, 8 mg/ml-2, 4 mg/ml-3, 2 mg/ml-4, 1 mg/ml-5 és 0,5 mg/ml-6 NiFe₂O₄-NH₂ (Sz) típusú MNP alkalmazásával a 10 legabundánsabb glikoformára nézve (GF: glikoformák). A: fluoreszcens intenzitás értékek ábrázolása. B: csúcs alatti területének százalékos eloszlása (CAT%). X tengelyen az alkalmazott MNP koncentrációkat tüntettem fel.

MNP felhasználhatóságát és a protokoll reprodukálhatóságát teszteltem egy nagy mintaszámú kísérletben: 38 Sclerosis Multiplex betegséggel diagnosztizált és

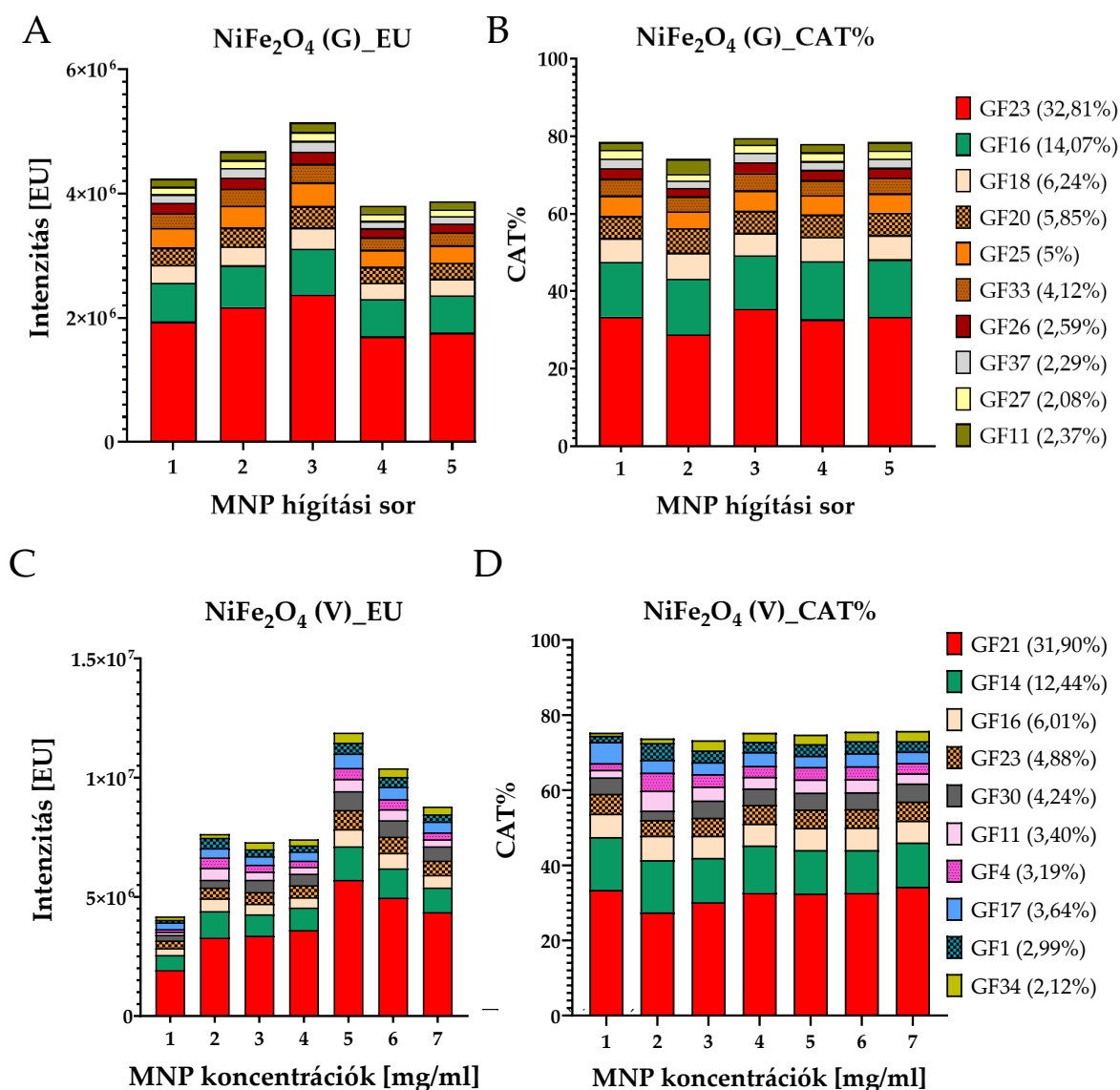
38 korban és nemben megegyező egészséges kontroll szérum mintának a teljes szérum N-glikozilációs analízisének mintaelőkészítésében teszteltem (részletesen a 4.2.1. alpontban) [93]. A kísérlet során a protokoll alapvetően jól működött, azonban a $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (Sz) MNP gyors ülepedése és aggregációja miatt további optimalizálásra volt szükség, hogy a pipettázási nehézségeket kiküszöböljem. A további alpontokban a glikolos és a vizes MNP alapú módszerek esetében a 4 mg/ml $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (Sz) MNPt standardként alkalmaztam.

Glikolos $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP optimalizálása különböző koncentrációk függvényében:

A $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP részecskék etilén-amin és glikol keverékében hagyva, stabilabb közeget mutatott, a szedimentáció szinte elhanyagolható volt. A $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (G) közegben 30×, 20×, 15× és 10× hígításokat alkalmaztam a kiindulási oldatból. A 9. ábra eredményei alapján megállapítottam, hogy a legmagasabb intenzitásértékeket a 20× töménységű $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (G) MNP-vel tisztított glikánok esetében kaptam, a csúcsok arányos eloszlása és alacsony szórása mellett.

Vizes $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP optimalizálása különböző koncentrációk függvényében:

A különböző $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (V) MNP koncentrációk (16 mg/ml, 8 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml és 0,5 mg/ml) hatékonyságát a glikáncsúcsokból származó intenzitás adatok (9. ábra C) alapján a 2 mg/ml, az 1 mg/ml és a 0,5 mg/ml MNP koncentrációk esetében kaptam a legmagasabb glikáncsúcs intenzitásokat. Mivel az optimalizálásnak a célja az is, hogy minél gazdaságosabb protokoll fejlesztésre kerüljön sor, és az könnyen automatizálható legyen, így a 0,5 mg/ml-s MNP koncentrációt kiválasztva végeztem el a további teszteket. Ezzel az alacsony koncentrációval is 4x nagyobb intenzitást kaptam, mint a referenciaként alkalmazott 4 mg/ml koncentrációjú $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (Sz) MNP esetében (K betű az oszlopdiagramon). Továbbá A CAT% szórása minimális maradt, így a módszer gazdaságosabb és automatizálhatóbb (9. ábra D).



9. ábra: Glikán tisztítás különböző töménységű (30×-2, 20×-3, 15×-4, 10×-5) NiFe₂O₄-NH₂ (G) és koncentrációjú (16 mg/ml-2, 8 mg/ml-3, 4 mg/ml-4, 2 mg/ml-5, 1 mg/ml-6 és 0,5 mg/ml-7) NiFe₂O₄-NH₂ (V) MNP protokollok felhasználásával a 10 legabundánsabb glikoformákhoz tartozó FLR intenzitás és CAT% értékek bemutatásával (GF: glikoformák). A: fluoreszcens intenzitás értékek ábrázolása NiFe₂O₄-NH₂ (G) közeg esetében. B: csúcs alatti területének százalékos eloszlása (CAT%) ábrázolása NiFe₂O₄-NH₂ (G) közeg esetében. C: fluoreszcens intenzitás értékek ábrázolása NiFe₂O₄-NH₂ (V) közeg esetében. D: csúcs alatti területének százalékos eloszlása (CAT%) ábrázolása NiFe₂O₄-NH₂ (G) közeg esetében. X tengelyen az alkalmazott MNP koncentrációkat tüntettem fel, ahol a K a kontrollként alkalmazott 4 mg/ml NiFe₂O₄-NH₂ (Sz) MNP-vel történő tisztítást jelenti.

A kísérletek alapján a 20× hígítású glikolos, illetve a 0,5 mg/ml vizes közegű MNP biztosította a legjobb tisztítási teljesítményt és reprodukálhatóságot, így ezek kerültek további optimalizálásra az elúciós pufferekkel végzett vizsgálatokban.

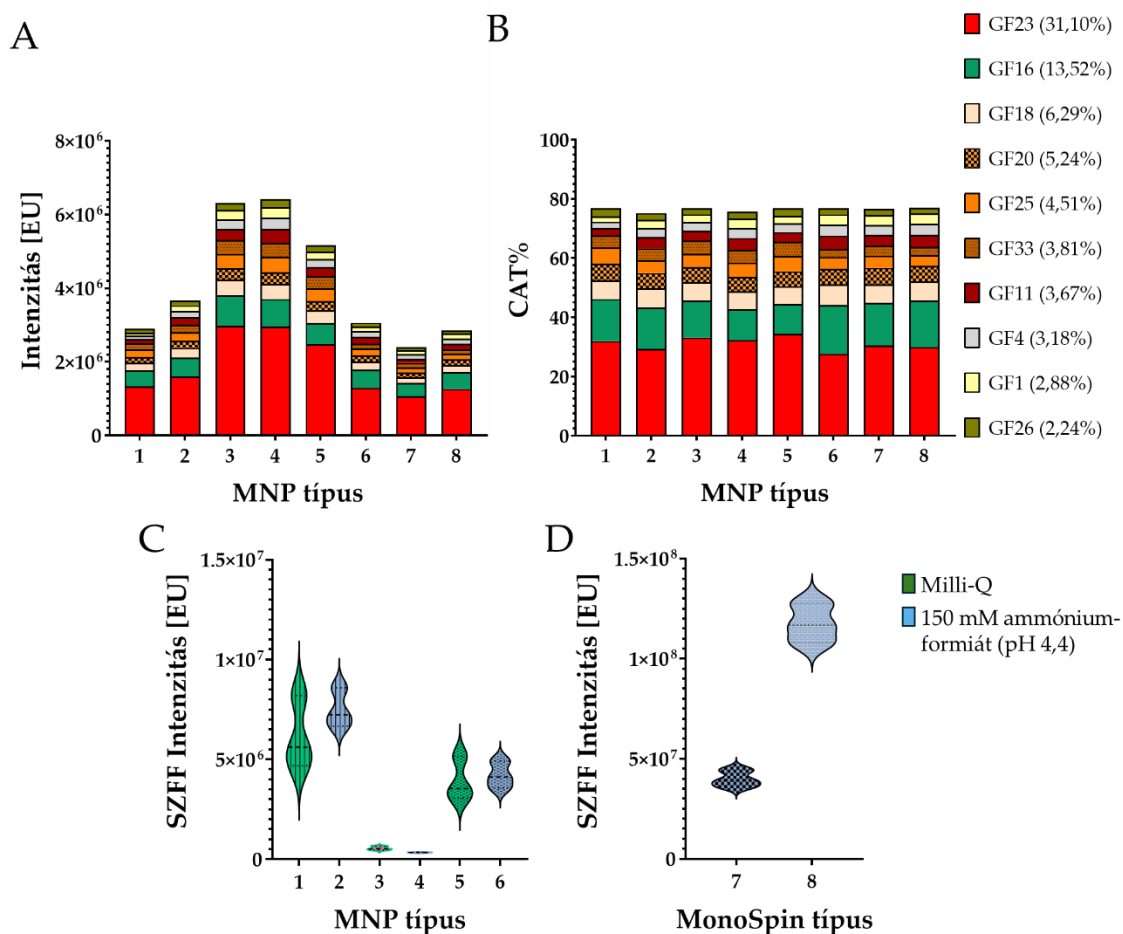
4.1.3. $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP közegeinek optimalizálása különböző elúciós pufferekkel és automatizálási tesztekkel

A diszperziós közeg optimalizálását követően kétféle elúciós puffert hasonlítottam össze:

- E1: ultratiszta Milli-Q víz (szakirodalomban leggyakrabban alkalmazot)
- E2: 150 mM ammónium-formiát oldat (pH 4,4), amelyet a kereskedelmi forgalomban elérhető, amin-oszloposkészletekhez ajánlanak.

Az összehasonlítás érdekében a kromatogramokon egységesen ugyanazt a 44 csúcsot integráltam. Az értékelés során a glikáncsúcsok intenzitását [EU], az átlagos csúcs alatti terület arányát [CAT%] vettem figyelembe, melyeket a 10. ábrán a 10 legabundánsabb glikoformára vonatkoztatva ábrázoltam.

Az 10. ábra A oszlopdiagramja alátámasztja, hogy az elúciós pufferek tesztelése során a legmagasabb glikáncsúcs intenzitást a 0,5 mg/ml $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (V) MNP-vel tisztított minták esetében értem el, mind a két elúciós pufferre nézve. A 4 mg/ml $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (Sz) MNP -nél az E2, míg a 20× $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (G) MNP közegben az E1 bizonyult hatékonyabbnak. A 10. ábrán a 7-es számmal egy gyári forgalomban kapható amin-funkcionalizált, 8-as számmal egy amid-funkcionalizált SPE alapú módszerrel tisztított minták eredményei láthatók. A 10. ábra A aldiagramja jól mutatja, hogy a gyári forgalomban kapható oszlopos módszerrel alacsonyabb intenzitást értem el a 10 leggyakoribb glikoformák összeintenzitására nézve, mint az MNP alapú módszerekkel. A CAT% eloszlások minden protokollnál hasonlóak voltak, ami igazolta az adatok összehasonlíthatóságát.



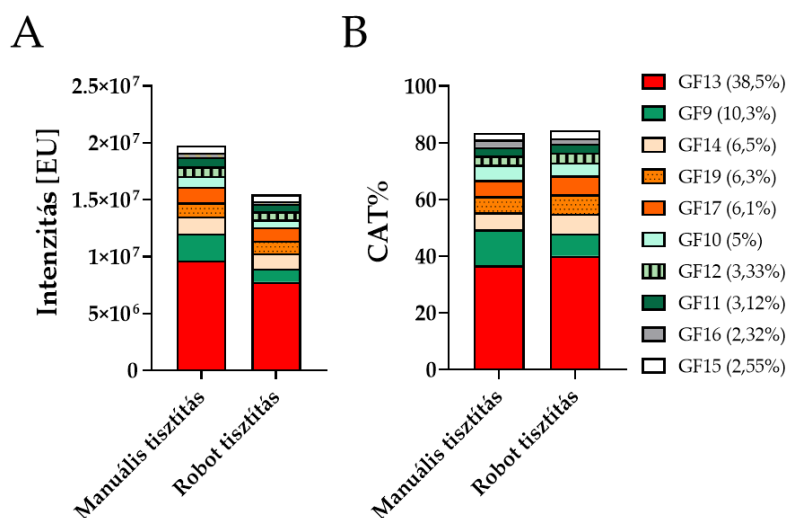
10. ábra: Elúciós pufferek hatékonyságának vizsgálata: MNP-alapú és gyári forgalomban kapható amin-és amid-funkcionalizált oszlopok glikán tisztítási protokollokban glikáncsúcs intenzitás CAT% ábrázolásával a 10 legabundánsabb glikoformára nézve, valamint SZFF intenzitás ábrázolása az alkalmazott protokollok hatékonyságának megkülönböztetésére.

(A) Összesített glikáncsúcs intenzitás ábrázolása. (B) CAT% értékek ábrázolása. (C) SZFF intenzitás [EU] az MNP protokollokra nézve. (D) SZFF intenzitás [EU] a MonoSpin alapú oszlopokra nézve. A diagramok X tengelyén megjelenő számozás: (1) 4 mg/ml $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (Sz) MNP, Milli-Q víz elúciós puffer; (2) 4 mg/ml $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (Sz) MNP, 150 mM ammónium-formiát elúciós puffer; (3) 0,5 mg/ml $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (V) MNP, Milli-Q víz elúciós puffer; (4) 0,5 mg/ml $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (V) MNP, 150 mM ammónium-formiát elúciós puffer; (5) 20× $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (G) MNP, Milli-Q víz elúciós puffer; (6) 20× $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (G) MNP, 150 mM ammónium-formiát elúciós puffer; (7) Amin-funkcionalizált oszlopokos módszer; (8) 150 mM ammónium-formiát elúciós puffer.

150 mM ammónium-formiát elúciós puffer; (8) Amid-funkcionalizált oszlopos módszer; 150 mM ammónium-formiát elúciós puffer.

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

- az intenzitás értékek nem különböztek szignifikánsan (11. ábra C),
- a CAT% eloszlás megegyezett a két mintaelőkészítés kivitelezése esetében, így reprodukálható volt az MNP-alapú tisztítás a robotikus platformon is (11. ábra B).



11. ábra: Automatizált MNP-protokoll összehasonlító diagramja a 10 leggyakoribb glikoforma bemutatásával CAT% és fluoreszcens intenzitás [EU] szempontjából (A) Összesített glikáncsúcs intenzitás [EU] ábrázolása. (B) CAT% értékek ábrázolása

4.1.4. Az MNP alapú glikán-tisztítási protokoll fejlesztésének összefoglalása

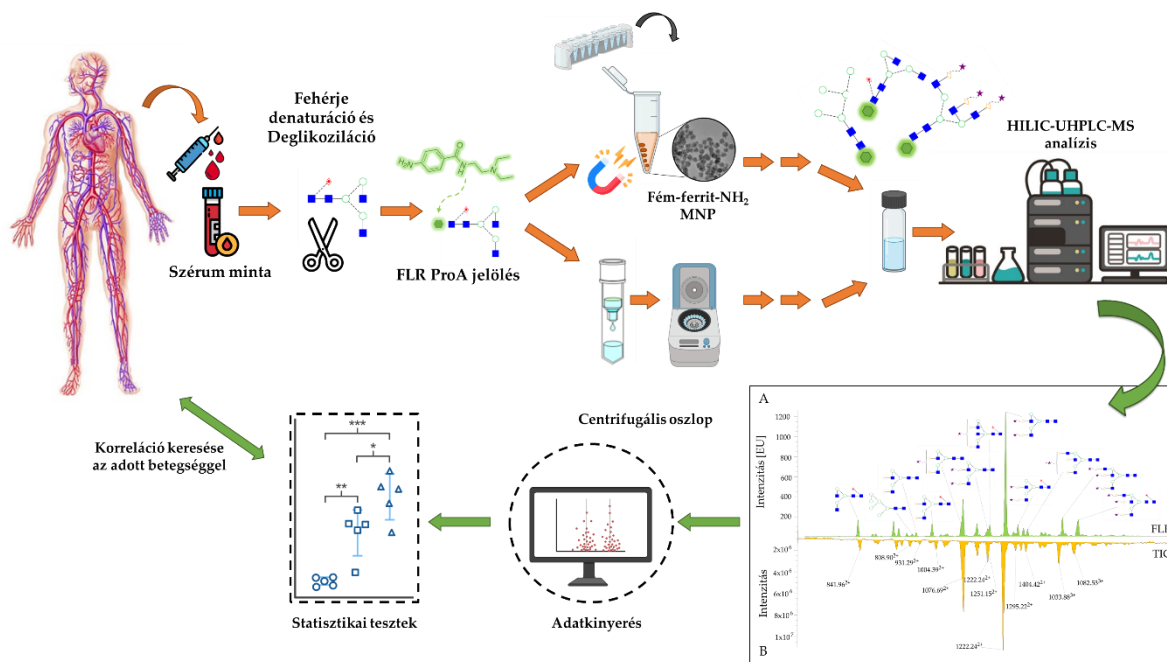
A disszertációm 4.1. alpontjában bemutatott kísérletek célja amin-funkcionalizált mágneses nanorészecskék glikán-tisztítási hatékonyságának optimalizálása, összehasonlítása és automatizálhatóságának vizsgálata volt.

- **Ferrit-alapú MNP-típusok összehasonlítása:** négyféle MNP glikán megkötési teljesítményét értékeltem (CV, glikáncsúcs-intenzitás, SZFF). A $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ típusú MNP adta a legjobb eredményt (alacsony CV, magas glikánintenzitás és alacsony SZFF-intenzitás). A koncentráció teszt szerint 4 mg/ml fölött a megkötés már nem javult.
- **Diszperziós közegek optimalizálása:** az zedimentáció mérséklésére a 20× glikolos és a 0,5 mg/ml vizes közegek bizonyult a leghatékonyabbnak mivel mindkét esetben magasabb glikán intenzitást kaptam, mint a standardként alkalmazott 4 mg/ml $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (Sz) típusú MNP esetében.
- **Elúciós pufferek összehasonlítása:** Milli-Q ultratiszta víz és 150 mM ammónium-formiát (pH 4,4) összehasonlításánál a 0,5 mg/ml koncentrációjú $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (V) MNP nem jelentkezett szignifikáns pufferkülönbség, viszont ez a típus felülmúlta nemcsak a többi MNP-variánst, hanem a kereskedelmi forgalomban elérhető centrifugális MonoSpin készleteket is, mind a glikán, mind az SZFF intenzitásban.
- **Automatizálhatóság tesztelése:** a 0,5 mg/ml $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (V) MNP-protokollt sikeresen alkalmaztam Hamilton MicroLab Prep platformon, amely megkönnyíti a jövőbeni nagy mintaszámú N-glikozilációs kísérletek reprodukálható és gyors kivitelezését.

4.2. Teljes szérum N-glikozilációs vizsgálatok gyulladásos betegségeken

Ebben az alrészben három gyulladásos betegség - sclerosis multiplex, COVID-19 és gyermekkori akut vakbélgyulladás - teljes szérum N-glikozilációját elemeztem nagyfelbontású analitikai módszerekkel (HILIC-UHPLC kromatográfia elválasztás és tömegspektrometria). A következő alpontokban részletesen bemutatom az egyes betegségekhez kapcsolódó eredményeket. Először a kohortok legfontosabb jellemzőit (mintaszám, minták közötti nemszerinti megoszlás), majd

egy külön alponthoz tartozó a statisztikai tesztek alapján kapott megállapításokat. A szérumban N-glikozilációs kísérletek lépéseit a 12. ábra foglalja össze.



12. ábra: Kísérleti munkafolyamat a szérumban N-glikozilációs minták elemzésére

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

A kromatogramok integrálásával kapott CAT% értékeket használtam fel adatként különböző statisztikai elemzések elvégzéséhez, mivel ez a megközelítés lehetővé teszi a glikánprofilok relatív mennyiségi összehasonlítását függetlenül az abszolút koncentrációtól. A százalékos eloszlás továbbá normalizálja az adatokat,

így kiküszöböli a mintaelőkészítési vagy injektált mennyiségből fakadó technikai variabilitást.

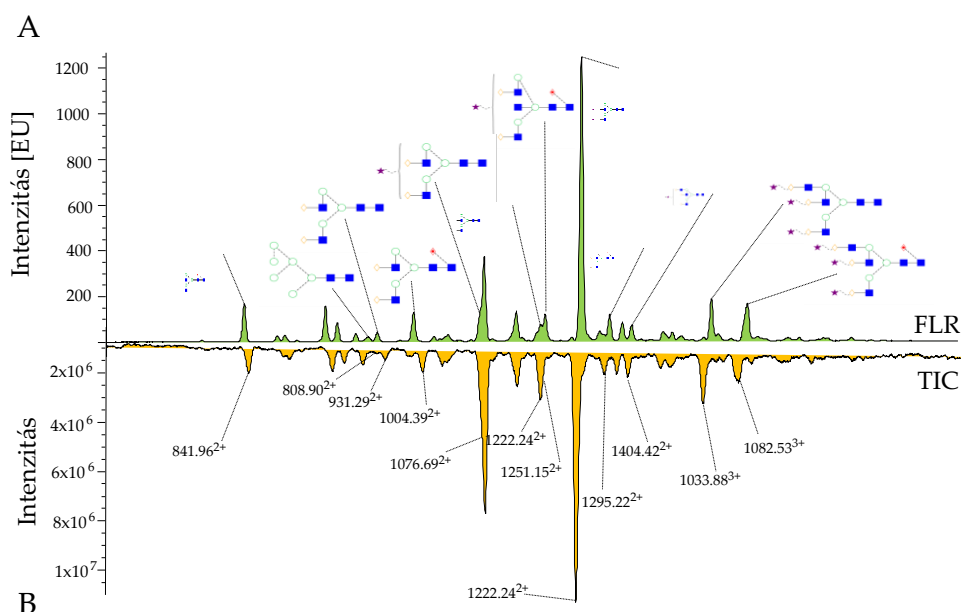
A statisztikai teszteket egyrészt az adatok normalitásának vizsgálatára, másrészt a beteg és egészséges mintacsoportok közötti szignifikáns különbségek feltárására, valamint az adatok közötti korrelációs összefüggések elemzésére végeztem el. Minden kísérletben az adathalmaz normalitásvizsgálatát Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltam. Mivel az adatok nagy része nem követte a normáeloszlást, így Mann-Whitney vagy Kruskal-Wallis nemparametrikus tesztet alkalmaztam a szignifikáns különbségek keresésére. Továbbá klasszifikációs tesztként lineáris diszkrimináns analízist (LDA), karakterisztikus görbe analízist (ROC) végeztem. Valamint vizualizációra heatmap, boxplot vagy pair plot ábrázolási technikát alkalmaztam.

4.2.1. Sclerosis multiplex

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

- Kontroll_Férfi (10 darab minta),
- SM_Férfi (10 darab minta),
- Kontroll_Nő (28 darab minta),
- SM_Nő (28 darab minta) csoportok lettek megkülönböztetve.

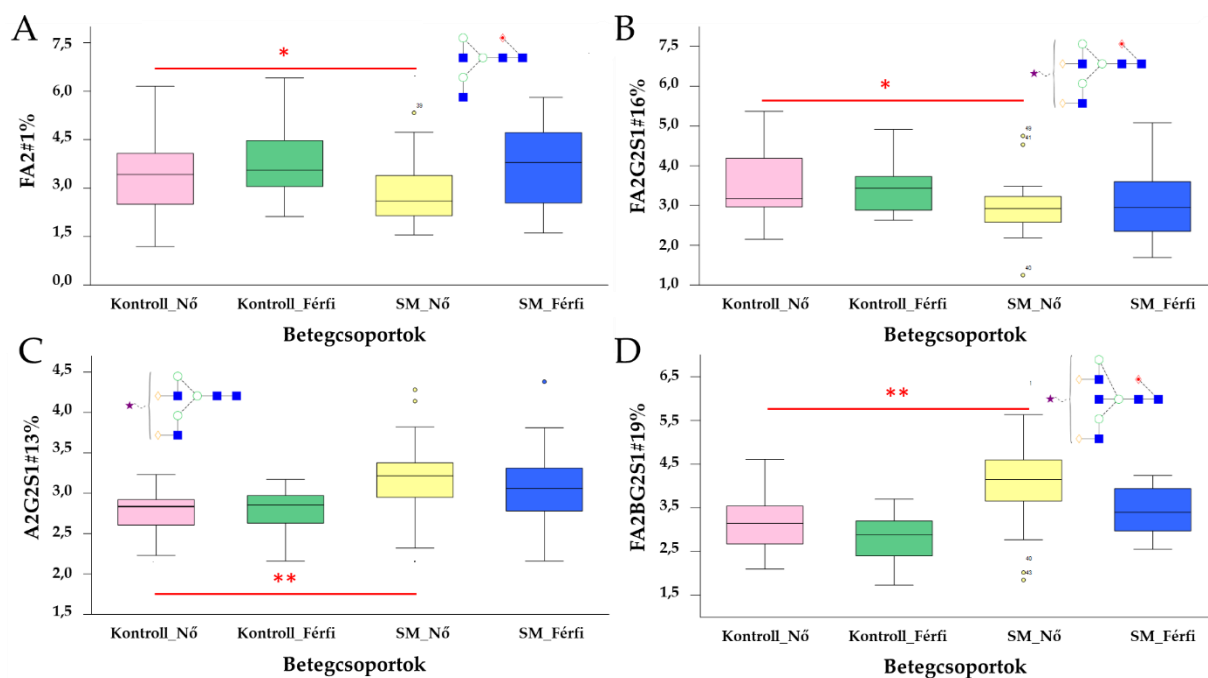
A beteg és egészséges csoportok szérummintáiból származó N-glikánok mintaelőkészítésében a 4.1.1. pontban meghatározott 4 mg/ml $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (Sz) MNP protokollt alkalmaztam. Az UHPLC (HILIC)-MS analízis során 43 darab jól definiált csúcsot azonosítottam az SM beteg és egészséges kontroll minták esetében egyaránt. A 13. ábrán az LC-MS analízis során kapott fluoreszcens kromatogram (A diagram) és a hozzá tartozó teljes ion kromatogram (TIC) (B diagram) tömegspektruma szemlélteti a legabundánsabb glikoformok megjelölésével az elválasztás minőségét.



13. ábra: A sclerosis multiplex kísérletből fluoreszcens kromatogram (A), valamint a teljes ion kromatogram az elválasztott N-glikánok $[m/z]^{2+/3+}$ értékei alapján (B). FLR: Fluoreszcens kromatogram, TIC: teljes ion kromatogram.

A kiértékeléshez alkalmazott statisztikai tesztek eredményei

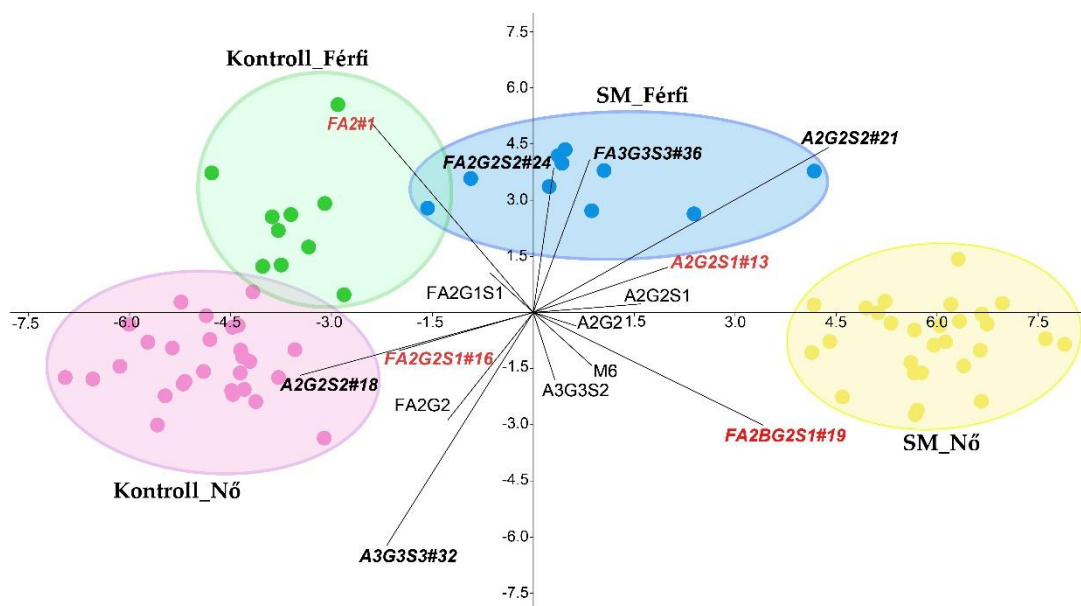
Az integrálással nyert CAT% adatokon végzett statisztikai tesztek eredményei alapján összesen 15 olyan N-glikán szerkezetet azonosítottam, melyek szignifikáns eltérést mutattak a Kontroll_Nő és SM_Nő mintacsoportok között. A boxplot diagrammon való ábrázoláshoz (14. ábra) kiválasztottam a legalább 3,0 CAT% értékkel jellemezhető és a mintacsoportok közötti összehasonlításban legalább $*p < 0,05$ szignifikancia szintet mutató N-glikoformákat. A kiválasztott N-glikánok közül a fukozilált és neutrális FA2#1 (A), valamint a fukozilált és mono-szialisált FA2G2S1#16 (B) struktúra szignifikáns csökkenést mutatott az SM_Nő mintacsoportban a Kontroll_Nő csoporthoz képest. Ezzel szemben az afukozilált A2G2S1#13 párja (C) és a biszektilált FA2BG2S1#19 párja (D) esetében szignifikáns növekedést figyeltem meg.



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

*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$.

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



15. ábra: Lineáris diszkrimináns analízis az SM és Kontroll mintacsoportok elválásának vizsgálatára. Piros színnel jelölve a Kruskal-Wallis tesztben szignifikánsan változott glikán struktúrákat. Fekete félkövér stílussal kiemelt glikoformok az LDA analízisben az első két tengely mentén kiemelkedő hozzájárulást mutattak:

A2G2S2#18 (RT: 26,78 perc; [1222,06]²⁺), A2G2S2#21 (RT: 28,23 perc; [1222,06]²⁺), FA2G2S2#24 (RT: 29,24 perc; [1295,09]²⁺), A3G3S3#32 (RT: 32,91 perc; [1550,17]²⁺), FA3G3S3#36 (RT: 34,21 perc; [1623,20]²⁺).

A Kruskal-Wallis és LDA elemzések alapján a mintacsoportok közötti különbségek több glikán esetében is szignifikánsnak bizonyultak. Szignifikáns eltérések főként a női mintacsoportok között voltak megfigyelhetők, amit négy kiemelt glikoforma is reprezentál.

4.2.2. COVID-19

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

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

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

Az N-glikoziláció elemzés előtt ELISA immunoassay készlet felhasználásával ellenőriztem a szérumminták SARS-CoV-2 ellen specifikusan termelődött IgG antitest szintjét. Az ELISA teszt elvégzése után a megfelelő minták kiválasztásával csoportonként 16-16 darab szérumminta került be az N-glikozilációs vizsgálatba, melyet 3.3.3. B alpont alapján amin-funkcionalizált centrifugális oszlop alkalmazásával és a 3.4.1. alpontban leírt beállításokkal HILIC-UHPLC-MS analízissel végeztem. 41 darab jól elvált N-glikán csúcsot azonosítottam.

ELISA Immunoassay teszt eredményei

Az ELISA Immunoassay teszt elvégzése után a Covid-Oltás- csoporton belül néhány mintában megfigyelhető volt a pozitív kontroll mintához tartozó küszöbértéktől ($[A] \geq 0,1$) magasabb abszorbancia, ami azt jelentette, hogy a szérum mintában jelen volt COVID-19 ellen termelődött specifikus-antitest. A pozitív eredményt mutató minták kizárásra kerültek az analízisből, mivel azok valószínűleg technikai artefaktumként vagy nem specifikus kötődés következtében adtak hamis pozitív reakciót. Az ELISA teszt eredményeit az 3. táblázat foglalja össze, ahol a legmagasabb abszorbanciát a Covid+Oltás+ mintacsoportban mértem (1,04), ezt követte a Covid-Oltás+ (0,69), ami a tesztben alkalmazott gyári pozitív kontroll abszorbanciájával (0,71) közel azonos volt. Majd a Covid+Oltás- csoport abszorbanciája volt a legalacsonyabb (0,4) pozitív értékű. A glikozilációs kísérletek során kontrollként a Covid-Oltás csoportot alkalmaztam, mivel ennek a csoportnak az abszorbanciája -

a pozitív hamis minták kizárásával - átlagosan 0,06 értékű volt, ami negatívnak tekinthető, azaz nem tartalmazott kimutatható mennyiségű, Covid ellen termelődött antitestet.

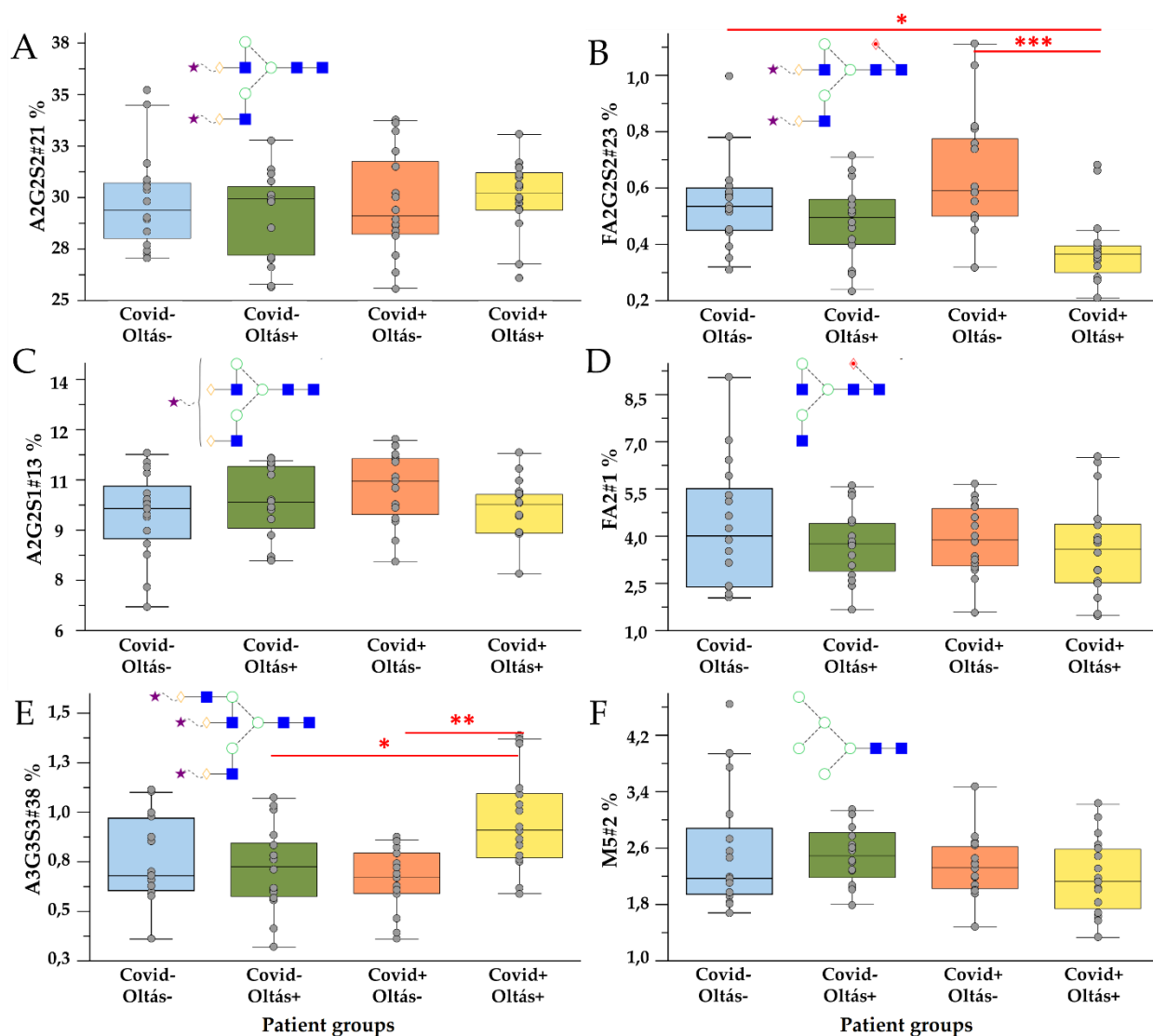
3. táblázat: ELISA Immunoassay teszt eredményének összefoglalása: a spektrofotometriás abszorbancia és a tesztben alkalmazott küszöbérték alapján meghatározott pozitivitás eredményeket tartalmazva. Abszorbancia küszöbérték: $[A]_{\text{pozitív kontroll}} \times 0,15 = 0,1$; negatív: $[A] < 0,1$; pozitív: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

Mintacsoport	Átlagolt abszorbancia [A]	Eredmény
Negatív kontroll	0,04	negatív
Pozitív kontroll	0,71	pozitív
Covid-Oltás-	0,06	negatív
Covid-Oltás+	0,69	pozitív
Covid+Oltás-	0,40	pozitív
Covid+Oltás+	1,04	pozitív

A kiértékeléshez alkalmazott statisztikai tesztek eredményei

A mintaszett több, mint 50%-a nem követte a normál eloszlást, így a szignifikáns különbségek keresésére Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztam. A mintacsoportok összehasonlítása alapján a szializáció különösen a COVID-19-en átesett csoportokban (Covid+) mutatott jelentős változást, elsősorban az oltottság hatására. A szialsavtartalom növekedése a Covid+Oltás+ csoportban volt a legjelentősebb (10. ábra A, C, E). A mono-szializált A2G2S1#13 még nem mutatott szignifikáns változást (C), viszont ahogy a szialsavak száma növekedett - A2G2S2#21 (A), A3G3S3#38 (E) - úgy lett egyre magasabb a glikán CAT% értéke a Covid+Oltás+ csoportban. A szializáció fontosságát az is alátámasztotta, hogy egyik neutrális struktúra sem mutatott szignifikáns változást, amit a 10. ábra D diagramon az FA2#1 és 10. ábra F diagramon bemutatott M5#2 neutrális struktúrák mutatnak be.

A fokozott szializáció az afukozilált struktúrákon volt megfigyelhető, amit megerősít az, hogy az FA2G2S2#23 esetében szignifikánsan alacsonyabb CAT% értéket detektáltam a Covid+Oltás+ csoportban (10. ábra B).

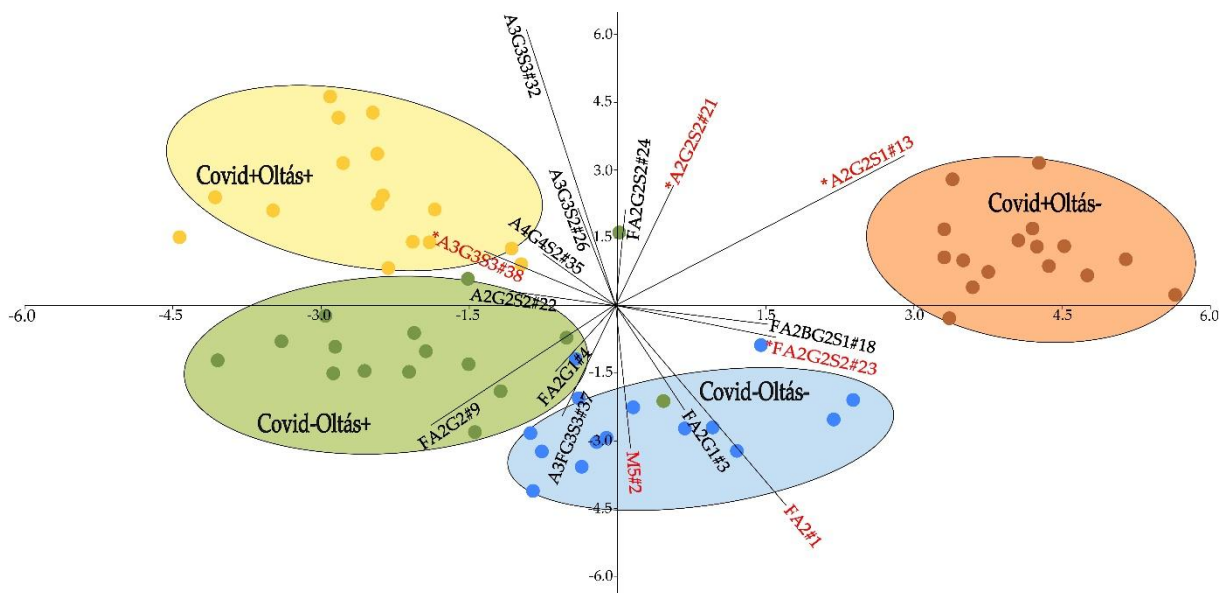


16. ábra: Szializált és neutrális glikánstruktúrák relatív abundanciájának (CAT%) változása a különböző COVID-19 mintacsoportokban.

A: A2G2S2#21 (RT: 26,30 perc; [1222,06]²⁺), B: FA2G2S2#23 (RT: 27,33 perc; [1295,09]²⁺; **p*=0,02; ****p*<0,001), C: A2G2S1#13 (RT: 22,47 perc; [1076,52]²⁺), D: FA2#1 (RT: 13,30 perc; [841,94]²⁺), E: A3G3S3#38 (RT: 34,12; [1550,18]²⁺; **p*=0,046; ***p*=0,01), F: M5#2 (RT: 14,67 perc; [727,89]²⁺). **: *p*≤0,01; ***: *p*≤0,001.

Az előző eredményeket a 17. ábrán bemutatott LDA elemzés eredménye is alátámasztotta, ahol a nem-fukozilált, szializált struktúrák a Covid+ csoportok elválásához, míg a neutrális és fukozilált struktúrák a Covid- csoportok elválásához járultak hozzá leginkább. A csoportok az SM kísérlethez hasonlóan jól elkülönültek

az első két diszkriminancia függvény alapján, mivel az x tengely 54,9%-ban, míg a második tengely 30,44%-ban határozta meg az összvarianciát.

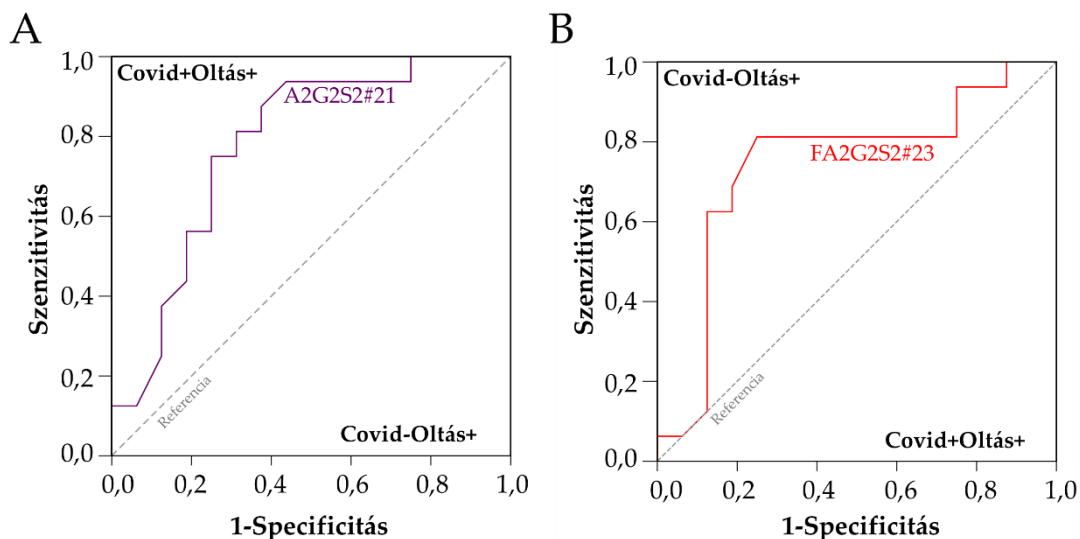


17. ábra: A glikán struktúrák területsszázalék-alapú diszkriminációja COVID-19 fertőzésen átesett (pozitív) és COVID-19 fertőzésen nem átesett (Covid-) csoportok között az oltottság függvényébe.

Piros színnel jelölve a 16. ábrán bemutatott struktúrák, * szimbólummal jelölve a szignifikánsan változó struktúrák: A2G2S2#21 (RT: 26,30 perc; [1222,06]²⁺), A2G2S1#13 (RT: 22,47 perc; [1076,52]²⁺), FA2G2S2#23 (RT: 27,33 perc; [1295,09]²⁺), FA2#1 (RT: 13,30 perc; [841,94]²⁺), A3G3S3#38 (RT: 34,12; [1550,18]²⁺), M5#2 (RT: 14,67 perc; [727,89]²⁺).

A fukoziláció és afukoziláció jelentőségét a 18. ábrán a ROC görbe eredményével is alátámasztottam, miszerint az afukozilált A2G2S2#21 struktúra a Covid+Oltás+ csoportot (A) és annak fukozilált párja az FA2G2S2#23 a Covid-Oltás+ csoportot (B) jellemzi szignifikánsan. Mind a két glikán 0,7 feletti görbe alatti területtel (AUC) és ahhoz tartozó alacsony varianciával (std. deviáció) jellemezhető, ami a teszt megbízhatóságát erősíti. Továbbá a $p < 0,05$ aszimptotikus szignifikancia értékek is alátámasztják a megfigyelést, hogy az eredmény nem véletlenül jött létre, az adott marker valóban elkülönül a pozitív és a negatív esetek között. Mindkét

biomarker esetében a konfidenciaintervallum alsó határa meghaladja a 0,5-ös értéket, ami alátámasztja a tesztek megbízhatóságát és a véletlen hatásának kizárását. (12. ábra C).



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

a. Nemparaméteres feltételezés mellett

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

18. ábra: A2G2S2#21 és FA2G2S2#23 glikánstruktúrák ROC analízise a fertőzésen való átesettség és az oltottság hatásának elkülönítésére.

A: A2G2S2#21 (RT: 26,30 perc; [1222,06]²⁺) struktúra ROC görbéje, amely a Covid+Oltás+ csoportot jellemzi, B: FA2G2S2#23 (RT: 27,33 perc; [1295,09]²⁺) struktúra ROC görbéje, amely az Covid-Oltás+ csoportot jellemzi. A ROC görbék alatti táblázat magába foglalja az AUC értékeket, a hozzájuk tartozó standard hibát, valamint a szignifikancia szinteket és 95%-os konfidenciaintervallumokhoz tartozó alsó-és felső határ értékeit.

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

4.2.3. Gyermekkori akut vakbélgyulladás

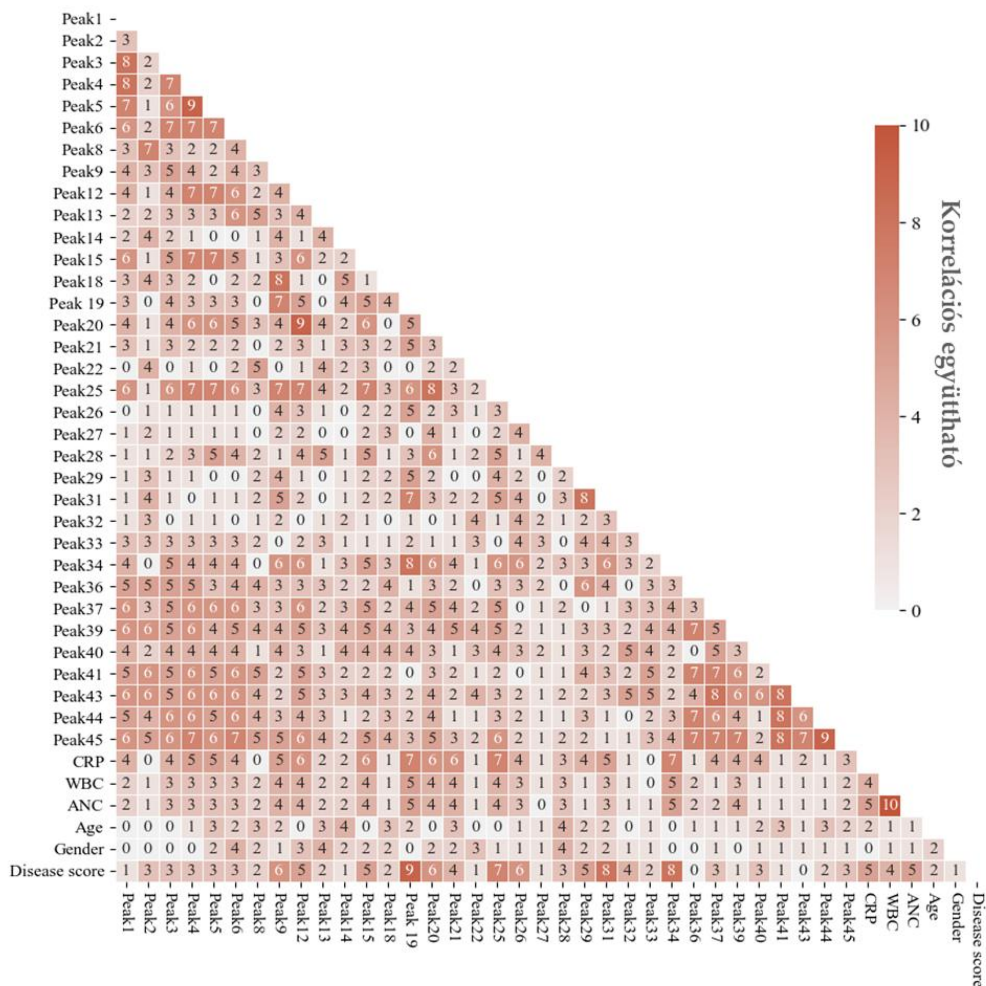
A vakbélgyulladással diagnosztizált gyermekektől vett szérumminták N-glikozilációs vizsgálatának kiértékelését két részre bontottam. A kísérletek kiértékelésekor először csak a beteg (A jelölés; 40 darab minta) és kontroll (K jelölés; 38 darab minta) csoportokat hasonlítottam össze, majd a második részben a kontroll csoporton belül a hasi fájdalommal betegfelvételre került gyermekektől vett szérumból álló alcsoportot különítettem el (HK jelölés; 9 darab minta) így három csoportos összehasonlítást végeztem. A mintákhoz C-reaktív fehérje (CRP), teljes fehérvérszám (WBC) és abszolút neutrofil sejtszám (ANC) laborértékek társultak, melyeket a statisztikai elemzésekben, mint független változókat vizsgáltam.

Az N-glikozilációs kísérletekben amin-funkcionalizált centrifugális oszlop alkalmazásával, a 3.3.3. B alpont alapján, végeztem el a tisztítást a mintaelőkészítésben, majd HILIC-UHPLC-MS analízist a 3.4.1. alpontban leírt beállításokkal végeztem el. Az elválasztást követően UNIFI szoftverben 48 darab jól elvált N-glikán csúcsot integráltam. A statisztikai elemzések egy részét és az ábrázolást Python szoftverben végeztük, melyben Dr. Garami Attila nyújtott segítséget.

2 csoportos kiértékelés alapját képző statisztikai tesztek

Fontos megjegyezni, hogy a statisztikai elemzésből kizártuk a 48 darab azonosított a glikánstruktúrák közül azokat, amelyek CAT%-értéke 0,4 alatti volt. A rangkorrelációs teszttel vizsgáltam a betegség és a glikánstruktúra összefüggését. A szignifikancia értékek szerint meghatározott korrelációs együtthatókat 0-tól 10-ig terjedő skálán színekódolással jelöltem és ábrázoltam a 19. ábrán látható hőtérképen. Az ábrán a különböző glikánokat számmal jelöltem (például Peak1, Peak2 stb.) a szoftverben való egyszerűbb kezelhetőség miatt. Az A2G2S1#19, A2G2S2#25, A2BG3S2#31 és A3G3S3#34 glikán struktúrák erős, lineáris összefüggést mutatnak a betegség jelenlétével (a hőtérképen "disease score"-ként jelölve), amit a 7 és 10 közötti korrelációs együttható (R) érték támaszt alá. Továbbá megfigyelhető volt, hogy a betegséggel erős lineáris korrelációt mutató struktúrák más glikán struktúrákkal

is hasonlóan erős korrelációt mutattak ($R \geq 7$). A legerősebb korreláció ($R=10$) az ANC és a WBC laborparaméterek figyeltem, aminek oka, hogy a WBC egy részhal-mazát képezi az ANC, így ha a WBC értéke nő, akkor az ANC is nőhet.



19. ábra: A Spearman- és Point-Biserial korrelációs elemzés hőképe, amely az egyes glikáncsúcsok vakbélgyulladás-betegségpontszámra gyakorolt hatását szemlélteti. A 7-nél magasabb értékeket erős korrelációnak tekintettük. (A paraméterpárok közötti korrelációs együtthatók értelmezése: 10^{-1} skálán.).

A 4. táblázat átláthatóan összefoglalja azokat a glikánokat, amelyek a teszt során szignifikáns korrelációt mutattak, azaz magas korrelációs értékkel rendelkeztek. A táblázat bal oldalán azok a glikánstruktúrák szerepelnek, amelyek erős kapcsolatot mutattak a betegséggel. A jobb oldalon ezekhez párosítva azok a glikánok láthatók, amelyek szintén szignifikáns korrelációt mutattak, de a glikánokkal és

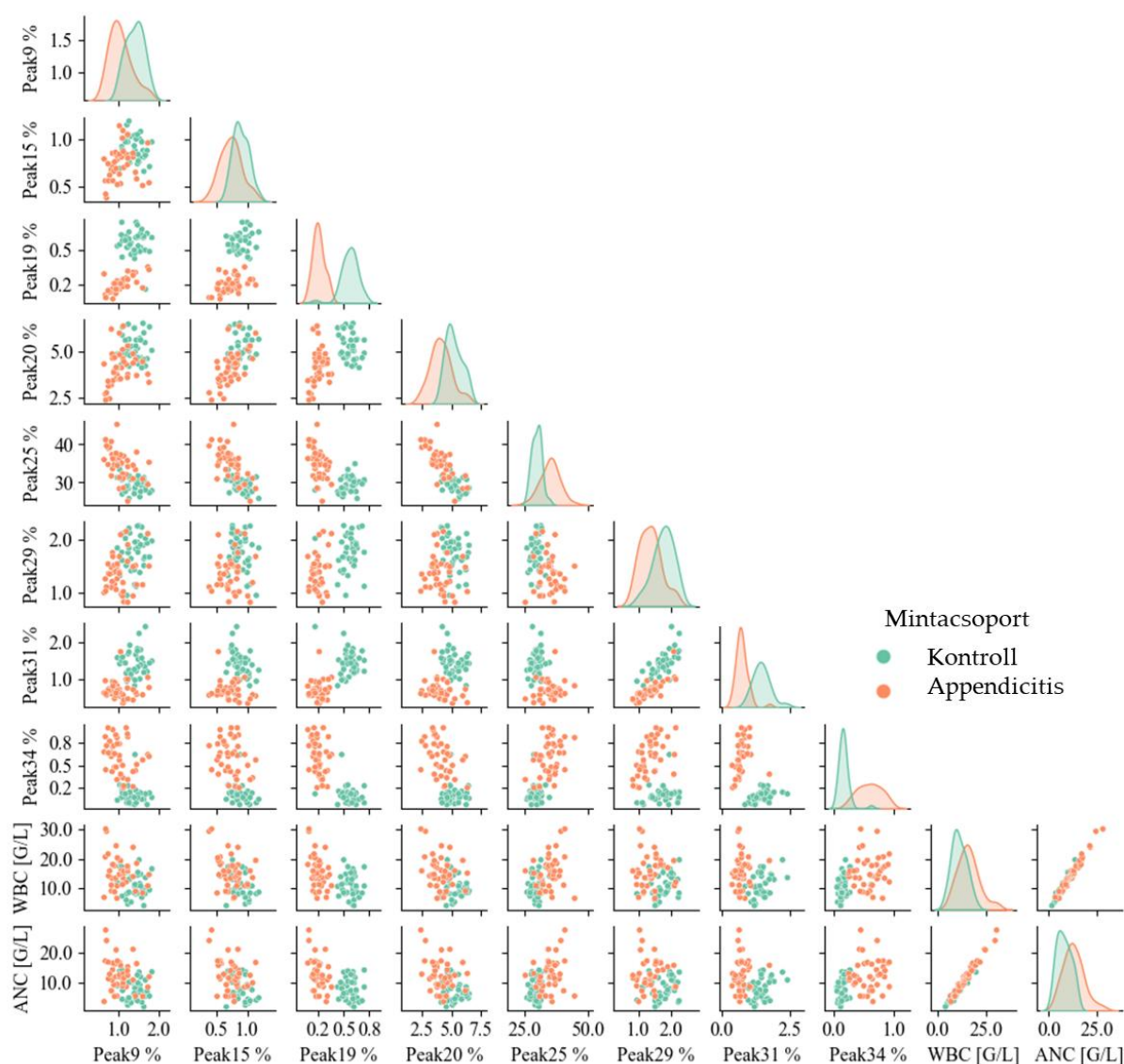
nem a betegséggel. A táblázat alsó részében pedig a laborparaméterek és glikánstruktúrák közötti korrelációs eredmények kerültek összefoglalásra.

4. táblázat: A glikánstruktúrák és betegség közötti korreláció Point-Biserial teszttel és a glikán struktúrák közötti korreláció Spearman-teszttel (zárójelben feltüntetve a korrelációs együttható értékek (R), a hőtérképről). A táblázat alsó részében pedig az adott klinikai paraméter és glikán struktúrák közötti Spearman-teszttel elvégzett korrelációs eredménye. CRP: C-reaktív fehérje, WBC: fehérvérsejtszám, ANC: abszolút neutrofil sejtszám

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

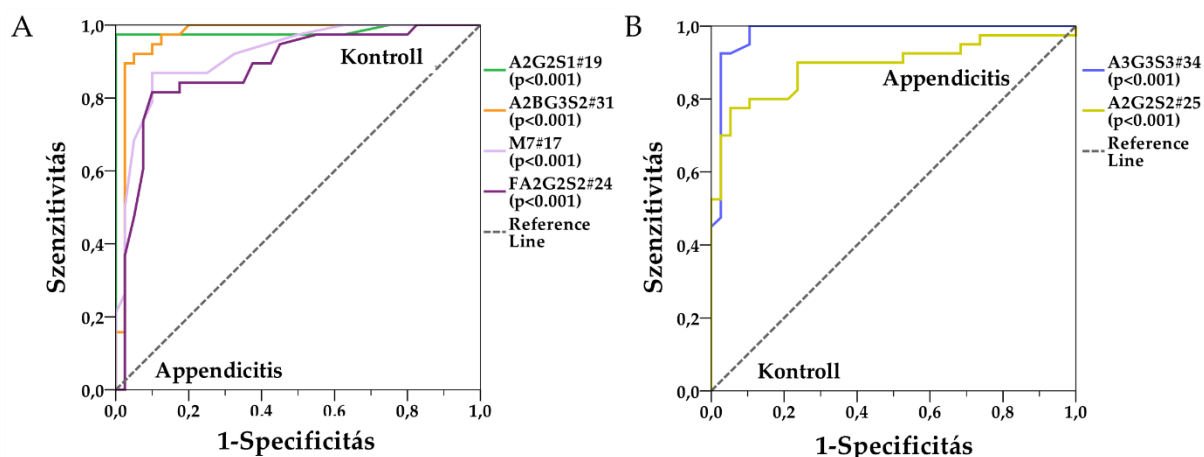
A kétcsoportos összehasonlítás (Mann-Whitney teszt alapján) során akpott statisztikailag szignifikánsan eltérő struktúrák már a hőtérképen is erős korrelációt jeleztek a betegséggel: A2G2S1#19, A2G2S2#25, A2BG3S2#31 és A3G3S3#34 (2. számú melléklet 3. táblázat). A mintacsoportok közötti szeparáció vizualizálására a 20. ábrán bemutatott pair plot diagramot használtam. Ez az ábrázolási mód szintén megerősíti azt az észrevételemet, hogy az A2G2S1#19, A2BG3S2#31 és A3G3S3#34 glikánstruktúrák CAT% értékének függvényében a kontroll- és a vakbélgyulladásos csoportok jobban elválnak egymástól. Az A2G2S1#19, A2BG3S2#31 és A3G3S3#34

struktúrák más glikánokkal mutatott korrelációja szintén befolyásolta a betegcsoportok közötti elkülönülés mértékét, pont azoknál a glikán pároknál, amelyeknél már a korrelációs együttható is magas volt. Például a magasabb CAT% értéke az A2G2S1#19 struktúrának és az alacsonyabb CAT% értéke az A3G3S3#34 struktúrának a kontroll csoportot jellemezte. Így megállapítható, hogy minél magasabb az A2G2S1#19 struktúra és minél alacsonyabb a A3G3S3#34 glikánok mennyisége annál pontosabb az elválás a két csoport között.



20. ábra: CAT% értéktől függően szignifikánsan eltérő glikánstruktúrák mintacsoportok (Kontroll és Appendicitis) közötti szeparációjának vizualizálása pair plot diagramon. A diagramon csak a Mann-Whitney teszt alapján szignifikáns és 0,5 értéktől magasabb CAT%-ú glikánok kerültek feltüntetésre.

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



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

a. Nemparaméteres feltételezés mellett

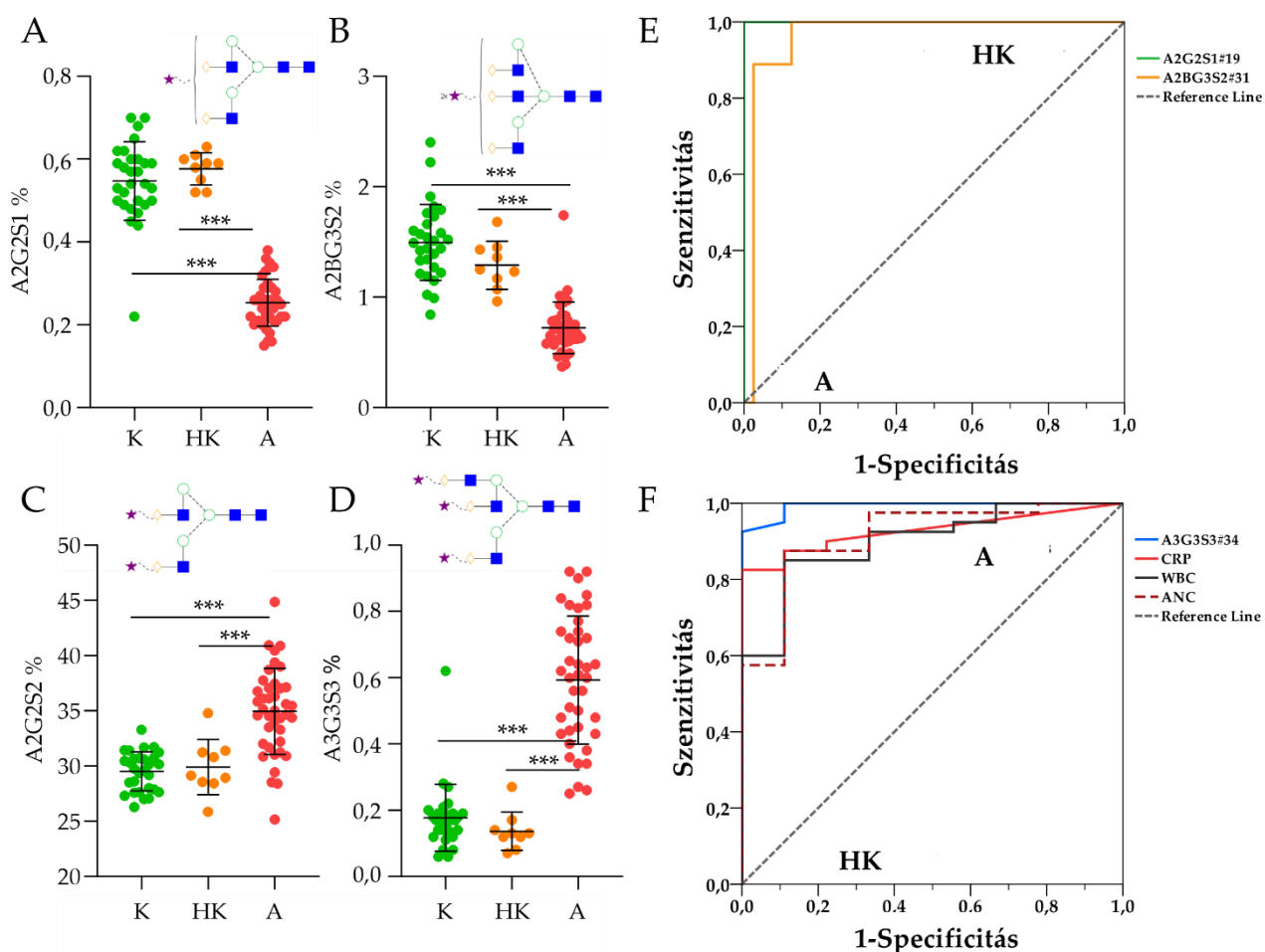
b. Nullhipotézis: a terület valódi értéke = 0,5

21. ábra: ROC görbe analízis a kontroll és az appendicitis mintacsoportok között a szignifikánsan változott glikán struktúrákra nézve.

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

3 csoportos kiértékelés alapját képező statisztikai tesztek

A három csoportos összehasonlítás eredményeként szignifikánsan változott glikánmintázatot figyeltem meg az afukozilált és szializált struktúrák mintázatára nézve, amit ROC-analízissel is alátámasztottam.



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

22. ábra: A glikán biomarkerek diagnosztikai potenciálja gyermekkori vakbélgyulladásban.

A - D: a normál kontroll (K), alhasi fájdalommal jelentkező kontroll (HK) és vakbélgyulladással diagnosztizált (A) csoportok közötti szignifikáns különbségek Kruskal–Wallis teszttel

(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; $[1550,18]^{2+}$; $p<0,001$). E-F: ROC analízis vizualizációja az appendicitis és alhasi fájdalommal jelentkező kontroll mintacsoportok között vizsgálva. ***: $p\leq 0,001$.

A korábbi konklúzióval összhangban azt tapasztaltam, hogy az alhasi fájdalommal jelentkező kontroll csoporthoz képest is lecsökkent a mono-szialiszt A2G2S1#19 (22. ábra A) és biszektilált A2BG3S2#31 (22. ábra B), valamint nőtt a di- és tri-szialisztak szintje a vakbélgyulladásos betegcsoportban, mint az A2G2S2#25 (22. ábra C) és A3G3S3#34 (22. ábra D).

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

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

4.2.4. Teljes szérum N-glikozilációs vizsgálatok összefoglalása

A dolgozat 4.2. alpontban bemutatott teljes szérum N-glikoziláció vizsgálatára irányuló kísérletekben három különböző patológiai állapotú gyulladásos betegséget vizsgáltam, a minták különböző szempontok szerinti csoportosításával. Különböző mintaszámú kohortokon belül a beteg mintákhoz nemben és korban megegyező egészséges kontroll minták lettek párosítva.

- **Sclerosis multiplex:** a nem szerint csoportosított beteg és kontroll minták között szignifikáns különbségeket találtam a női csoportokat illetően: fukozilált és neutrális FA2#1, a fukozilált és mono-szialiszt FA2G2S1#16 csökkenését, illetve az afukozilált A2G2S1#13, valamint a biszektilált FA2BG2S1#19, növekedését figyeltem meg.
- **COVID-19:** a fertőzés és az mRNS-vakcináció eltérő mintázatokat eredményezett; a szialisztáció és a fukoziláció aránya bizonyult legfontosabb szeparáló tényezőnek. A szialisztáció jelentősége szembetűnő volt a Covid+Oltás+ csoportban, amit az LDA által kimutatott csoportszeparáció, a boxplot-analízis és a ROC görbe is megerősített. A szialsav számának növekedése és a fukoziláció csökkenése a Covid+ csoportokban, szoros összefüggést mutatott az oltottsággal.
- **Gyermekekori akut vakbélgyulladás:** a szialisztált glikánok emelkedett, míg a semleges struktúrák csökkent szintje, valamint a laborparaméterek kombinációja erős diagnosztikai potenciált mutatott. A glikánok arányára nézve, olyan küszöbértéket határoztam meg, amelyek egyértelműen elkülönítik a vakbélgyulladást a hasi fájdalommal rendelkező kontroll és a normál egészséges csoporttól.

5. Összefoglalás

A glikoziláció a fehérjék egyik leggyakoribb poszttranszlációs módosulása, amely során komplex cukormolekulák kapcsolódnak a fehérjék meghatározott aminosavjaihoz, létrehozva a biológiai folyamatokban kulcsszerepet játszó glikoproteinek. Az N-glikoziláció, ahol a glikán jellemzően aszparagin oldalláncához kapcsolódik, számos sejtfunkció szabályozásában vesz részt, és változásai érzékeny jelzői lehetnek kóros állapotoknak, többek között krónikus és akut gyulladásoknak [2]. Mivel a glikozilációs mintázat dinamikusan változik a sejtek enzimatikus és metabolikus állapotának függvényében, szerkezeti és mennyiségi elemzése kiemelt jelentőségű a biomarker-kutatásban. Az ezzel foglalkozó tudományterület napjainkban analitikai módszerek kombinálása. A glikoanalízis nagy felbontást biztosító és legelterjedtebb eszközei a folyadékkromatográfia és tömegspektrometria [3, 12]. A glikánok kis mennyisége és érzékenysége miatt a vizsgálat mintaelőkészítése gondos, precíz optimalizálást igényel. Az elmúlt évek tapasztalatai rámutattak, hogy a mintaelőkészítés során a glikánok tisztítására alkalmazott módszerek - mint például a kromatográfiás tisztítás vagy a SPE módszeren alapuló eljárások - gyakran nagy mennyiségű eluenszt eredményeznek, amelyet az analitikai vizsgálatot megelőzően, jellemzően vákuumcentrifugálással kell koncentrálni. Ez a lépés nemcsak időigényes, de költséges is. Ezért egyre nagyobb figyelem irányul az alternatív, egyszerűbb megoldásokra, például a kereskedelmi forgalomban elérhető mágneses gyöngök, hidrofíl kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfiás (HILIC)-módszeren alapuló szűrőhegyek vagy a könnyen előállítható és költséghatékony mágneses nanorészecskék alkalmazása, amelyek hatékonyabbá tehetik a glikánok analízisét [4, 5, 61]. Mindezek alapján a kutatásom két fő célt határozott meg, melyek eredményeit két fejezetben mutattam be:

1. A disszertáció célja egyrészt egy új, költséghatékony és automatizálható N-glikán tisztítási protokoll kifejlesztése volt, amin-funkcionalizált mágneses nanorészecske (MNP) felhasználásával.

A kísérletek során négy különböző amin-funkcionalizált MNP-típust vizsgáltam, összehasonlítva azok szérumból származó N-glikán megkötési hatékonyságát és reprodukálhatóságát humán mintából. A mintaelőkészítés során a PNGase F enzimmel történő N-glikán felszabadítást, prokainamiddal (ProA) történő fluoreszcens követte, majd a glikánt a felesleges szennyezőktől MNP-alapú protokollokat alkalmazva távolítottam el. Ezt követően ultranagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztást fluoreszcens detektálással kombinálva (HILIC-UHPLC-FLD) vizsgáltam a szérumból származó N-glikánokat. A fluoreszcens kromatogramon megjelenő csúcsok integrálásával kapott adatokat - mint intenzitás, relatív csúcs alatti terület százalékos eloszlás (CAT%), fluoreszcens festékből származó intenzitás (SZFF) - használtam fel a különböző MNP-alapú protokollok összehasonlításához. A kutatás során megállapítottam, hogy a $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP kiemelkedő teljesítményt nyújt a glikánok megkötésében a többi ferrit-alapú MNP-vel szemben. Mindezt alacsony szórású CAT%-érték, magas glikáncsúcs-intenzitás, valamint alacsony SZFF intenzitás támasztotta alá. Ezt az MNP-protokollt sikeresen alkalmaztam egy nagy mintaszámú sclerosis multiplex betegségre irányuló teljes szérumból származó N-glikán analízis mintaelőkészítése során. A további optimalizálási lépések az MNP-protokoll automatizálásának céljából valósultak meg. Mivel a szárított formában vízbe visszavett MNP-k gyors ülepedése pipettázási hibákat okozhat, így a $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP-t megvizsgáltam koncentráció- és diszperziófüggés szempontjából. A szedimentációs problémák megoldására a nanorészecskék glikolos ($\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (G)) és vizes ($\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (V)) diszperziós közegeit vizsgáltam. A 0,5 mg/ml koncentrációjú $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (V) MNP alkalmazásával kaptam a legjobb eredményeket, amelyek felülmúlták a többi MNP-variánst és a kereskedelmi forgalomban kapható centrifugális oszlopos készleteket is. Továbbá igazoltam, hogy az MNP-alapú protokoll reprodukálhatóan integrálható Hamilton MicroLab Prep folyadékkezelő platformra és elvégezhető az automatizált N-glikán mintaelőkészítés, ami nagyban megkönnyíti a további nagy mintaszámú szérumból származó N-glikozilációs analíziseket.

2. A dolgozat másik célkitűzése, három különböző kórkép - sclerosis multiplex (SM), COVID-19 és akut vakbélgyulladás - teljes szérum N- glikozilációs mintázatának vizsgálatára irányult.

Az eddigi irodalmi adatok kiegészítésével és új szempontok bevezetésével az SM esetében a minták nem szerinti csoportosítását, a COVID-19 kísérletben a Pfizer BioNTech mRNS-alapú vakcináció hatását vizsgáltam. A vakbélgyulladás vizsgálatakor egyrészt elsőként végeztem N-glikozilációs elemzést, másrészt a mintacsoportok kialakításával céltom az volt, hogy azonosítsak egy olyan glikánalapú biomarkert, amely képes megkülönböztetni a valódi vakbélgyuladást a hasi fájdalom miatt felvett gyermekek diagnózisától.

A kísérletekben a beteg mintákhoz nem és korban párosított kontroll mintákat választottam, illetve létrehoztam a kohortokon belüli mintacsoportokat. Az SM esetében a mintákat nemek szerint négy alcsoportba soroltam, míg a COVID-19 vizsgálatban a fertőzés és a Pfizer–BioNTech mRNS-alapú vakcináció alapján alakítottam ki négy csoportot. A vakbélgyulladás kísérletsorozatban a kontrollok között szerepelt egy alcsoport, akik normál CRP-érték mellett, de alhasi fájdalommal kerültek felvételre. A kísérletsorozat két részből állt, először csak a kontroll és a beteg mintacsoportokat hasonlítottam össze, majd kíváncsi voltam, hogy az N-glikánmintázat alapján elkülönül-e az alhasi panaszokkal rendelkező kontroll csoport is a vakbélgyulladásos csoporttól vagy sem. Az elemzés során összehasonlítottam a vakbélgyulladásos (A), a normál kontroll (NK) és a hasi panaszokkal felvett (HK) csoportokat, hogy megállapítsam, az N-glikánmintázat alapján elkülöníthetők-e.

A kísérletek mintaelőkészítésében az előzőekben bemutatott mintaelőkészítési lépéskete végeztem el, azonban a COVID-19 és a vakbélgyulladás mintacsoportokhoz amin-funkcionalizált centrifugális oszlopot alkalmaztam. Ennek oka, hogy az optimalizálás és ezen betegségek N-glikozilációs elemzése egyidejűleg zajlott. A HPLC-s elválasztást követően kohortonként kerültek azonosításra a glikán csúcsok, így eltérő retenciós idővel azonosítottam a kromatogramokon megjelenő glikán csúcsokat. Továbbá eltérő számú glikoforma került meghatározásra, viszont mind a

három kísérletben több mint 40 glikánt detektáltam. A fluoreszcens kromatogram integrálásával határoztam meg az egyes glikánok CAT% értékeit, majd azokat mintacsoportonként statisztikai elemzésekhez használtam fel, majd az eredmények segítségével állapítottam meg a betegségre jellemző N-glikánmintázatot és a csoportok közötti különbségeket.

Az SM jelenlegi diagnosztikai gyakorlata elsősorban a rutinszerűen alkalmazott MRI vizsgálatra, valamint cerebrospinális folyadékból (CSF) kimutatott oligoklonális IgG sávok azonosítására épül. Az irodalmi adatok alapján azonban ez a diagnosztikai paletta hasznosan kiegészíthető lenne mind a szérum glikoproteinek, köztük az IgG, mind az említett CSF-ben található oligoklonális IgG N-glikozilációs mintázatának vizsgálatával. Az értekezésben bemutatott eredmények arra utalnak, hogy az SM-ben megfigyelt glikozilációs eltérések nemi specifitást mutatnak, különösen a fukoziláció összefüggésében. A fukozilált és mono-szialiszt (FA2G2S1#16) vagy nem szialiszt (FA2#1) struktúrák, szignifikánsan csökkentek a SM_Nő vizsgált mintacsoportban. Ezzel szemben az afukozilált A2G2S1#21 és ennek fukozilált és biszektilált GlcNAc-t tartalmazó párja (FA2BGS1#19) szignifikáns növekedést mutatott. Ez a mintázat arra utal, hogy a fukoziláció összességében csökken a SM_Nő csoportban, ugyanakkor a biszektilált GlcNAc jelenléte módosíthatja vagy ellensúlyozhatja ezt a változást. A fukozilált N-glikánok rendkívül jellemzőek az IgG-re, ezért teljes szérum N-glikoziláció vizsgálatánál a fukoziláció jelentős változása utalhat az IgG magfukozilációjának megváltozására is. A csökkent fukoziláció gyakran a gyulladásos mediátorok (pl. citokinek) által kiváltott glikán-bioszintézis átprogramozódásának következménye [11]. A biszektiláció autoimmun betegségekben, mint a sclerosis fokozhatja az immunválaszt, ami magyarázhatja a biszektilált forma arányának növekedését.

A COVID-19 esetében a korábbi tanulmányok döntően a fertőzés súlyosságával, a betegség lefolyásával és az akut immunválasz jellemzőivel hozták összefüggésbe a fertőzéshez kapcsolódó N-glikozilációs változásokat, míg a vakcináció

önálló hatásmechanizmusát és a posztinfekciós glikánmintázatok alakulását kevésbé vizsgálták. A dolgozatomban bemutatott eredmények alapján a mRNS-alapú vakcináció és a fertőzés eltérő N-glikozilációs mintázatokat eredményezett. A szializáció mértéke és az fukoziláció erős markernek bizonyult, amit LDA, boxplot-analízis és ROC görbe elemzés is megerősített. A szializáció mértéke szoros összefüggést mutatott a fertőzésen átesettek csoportjában az oltottsággal, ami feltételezi, hogy a Pfizer-BioNTech mRNS-vakcina hatására módosult a szérum N-glikánmintázat a nem fertőzött és nem oltott mintacsoportokhoz képest. A szializációs fok növekedése az oltottság hatására valószínűleg a citokin fehérje által megváltozott a glikán bioszintézisnek köszönhető. Az interleukin-6, mint egy jelátvivő citokin fehérje által vezérelt akut fázisú válasz során fokozódik a szialil-transzferáz enzimek expressziója, amit COVID-19 fertőzés esetén a vakcináció és a korábbi fertőzés immunológiai hatásai együtt alakítottak ki [52]. Ez átfedésben van a korábban is kimutatott teljes plazma N-glikánmintázatában megfigyelttel, miszerint a COVID-19 fertőzés során nő az antennaritás aránya, főként az α 2,6-szializált glikánok esetében, miközben a biszekció és a magfukoziláció csökken [57, 58]. A fukoziláció COVID-19 fertőzéssel való összefüggése csak az oltott mintacsoportokban volt megfigyelhető: az A2G2S2#21 (afukozilált) a Covid+Oltás+ csoportot, míg az FA2G2S2#23 (fukozilált) a Covid-Oltás+ csoportot jellemezte. A fukoziláció és afukoziláció ellentétes irányú változása arra utal, hogy fukozil-transzferáz enzimek expressziója megváltozott a Pfizer-BioNTech mRNS-vakcina hatására, a fertőzésen átesettek körében. A szializáció és a fukoziláció markerként különíthette el a csoportokat, ami a vakcina immunológiai hatásának glikánszintű következményeire utal. Eredményeim hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a jövőben a glikánprofilok a vakcinációs válasz és a fertőzés lefolyásának biomarkereiként szolgáljanak.

Irodalmi adatok szerint akut gyulladás során számos májban termelődő akut fázisfehérje, mint például az α 1-savanyú glikoprotein vagy az α 1-antitripszin, kifejezett N-glikozilációs változásokat mutat, különösen a szialsavas di-antennás struk-

túrák megjelenésének fokozódása jellemző. Ez összhangban van a jelen vizsgálatban megfigyelt di- és tri-szialiszt glikánok arányának növekedésével, ami a vakbélgyulladás akut gyulladásos jellegét támasztja alá. A gyermekpopulációban végzett vizsgálatok erős diagnosztikai potenciált mutattak. Az A2G2S1#19, A2BG3S2#31, A2G2S2#25 és A3G3S3#34 glikánok erősen korreláltak a betegség jelenlétével. A mono-szialiszt (A2G2S1#19) és biszektilált (A2BG3S2#31) struktúrák szintje csökkent, míg a di- és tri-szialiszt glikánoké (A2G2S2#25, A3G3S3#34) emelkedett az appendicitisben. A semleges glikánok alacsonyabb szintje és a szialiszt struktúrák magasabb aránya jelentősen hozzájárult a vakbélgyulladásos betegek és kontrollok elkülönítéséhez. Az A2G2S1#19 CAT%>0,44 és A3G3S3#34 CAT%<0,25 küszöbértékek együttes alkalmazása magas megbízhatósággal azonosította a vakbélgyulladásos eseteket. A laborparaméterekkel (CRP, WBC, ANC) kombináltan az A3G3S3#34 kiváló prediktív teljesítményt mutatott. A vakbélgyulladásban megfigyelt magasabb szialiszt fok összhangban van a gyulladás hatására termelődött citokinek glikozilációra mért hatásával [48]. A citokinek túltermelődése miatt szialiszt-transzferáz enzimek fokozottan expresszálódnak, így a glikánok inkább magasabb fokú szialisztációt kapnak, miközben például a biszekció, fukoziláció visszaszorul [12]. Ez az N-glikánmintázat az akut fázisfehérjékre szintén jellemző [44].

Összességében a napjaink egyik glikán analitika részeként kezelt mintaelőkészítés kihívásaira kifejlesztett MNP-alapú módszer egy gyorsabb, egyszerűbb és költséghatékonyabb alternatívát kínál a hagyományos technikákkal szemben, lehetővé téve a koncentrációs lépések minimalizálását és a mérési pontosság növelését. Továbbá a teljes szérum N-glikozilációra irányuló vizsgálatok eredményei rámutattak arra, hogy a glikozilációs mintázatokban egyértelmű eltérések figyelhetők meg a különböző betegségek és az egészséges kontroll csoportok között, amelyek fontos információval szolgálhatnak a betegségek patomechanizmusának megértéséhez és potenciális kiegészítő diagnosztikai lehetőségeket nyújthatnak. Biomarker fejlesztés: szialisztáció és fukoziláció szintje használható lehet a sclerosis multiplex nem-

specifikus diagnózisára, a vakcináció hatékonyságának vagy a fertőzés lezajlásának nyomon követésére vagy az akut heveny gyulladás és egy krónikus alhasi fájdalom elkülönítésére. Klinikai gyakorlat: hosszabb távon akár személyre szabott vakcinációs stratégiák kialakítását is támogathatja.

5. táblázat: Teljes szérum N-glikozilációs profilok betegségenként - összefoglaló áttekintés

Betegség	Glikoforma	Változás	Változás jelentősége
sclerosis multiplex	Fukoziláció (FA2G2S1#16, FA2#1)	csökkenés	A fukoziláció szignifikáns csökkenése a neutrálisabb cukroknál volt megfigyelhető, amik nagy százalékban az IgG-ről származnak, így akár gyulladásos mediátorok (pl. citokinek) hatására bekövetkező glikánbioszintézis-átprogramozódás eredménye lehet. A biszektiláció autoimmun betegségekben fokozhatja az immunválasz kialakulását.
	Afukoziláció (A2G2S1#21) Biszektilált GlcNAc (FA2BG51#19)	növekedés	
COVID-19	Fukoziláció (FA2G2S2#23)	csökkenés (minden csoporthoz képest C+O+ csoportban)	A fukoziláció és afukoziláció arányeltolódását az oltás és a fertőzés együtt módosíthatja a fukozil-transzferáz enzimek működését. A szializáció növekedése a citokin fehérje által vezérelt akut fázisú válaszhoz kapcsolódik, amely fokozza a szialil-transzferáz enzimek expresszióját.
	Szializáció (A2G2S1#13, A2G2S2#21, A3G3S3#38)	szialsavak száma összefügg a C+O+ csoportban való százalékos növekedéssel	
akut vakbélgyulladás	Szializáció (A2G2S1#19, A2BG3S2#31, A2G2S2#25, A3G3S3#34)	mono-szializáltság és biszekció csökkenés, di-és tri-szializáltság növekedés	A szializációs fok növekedése és a biszektilált GlcNAc csökkenése az akut fázisú, citokin vezérelt glikozilációs átrendeződésre utal, amelyben a glikánok inkább magasabb fokú szializációt kapnak, miközben a biszekció visszaszorul

6. Új tudományos eredmények

1. **Megállapítottam, hogy az újonnan fejlesztett mágneses nanorészecske-alapú N-glikán tisztítási protokoll reprodukálhatóan alkalmazható glikoanalitikai mintaelőkészítésben glikán megkötésre, amely automatizálható protokollt is jelent egyben.** Gyorsabb, egyszerűbb és automatizálható alternatívát nyújt a hagyományos kromatográfiás és szilárd fázisú extrakciós módszerekhez képest, minimalizálva a koncentrációs lépések szükségességét és növelve a mérési pontosságot.
2. **Összehasonlítottam négy különböző amin-funkcionalizált mágneses nanorészecske (MNP) teljesítményét,** és megállapítottam, hogy a $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ típus kiemelkedő glikán-specifikus kötési hatékonysággal, alacsony szórású CAT%-értékekkel, magas csúcsintenzitással és hatékony festékeltávolítással rendelkezik.
3. **Optimalizáltam a $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNP koncentrációját, diszperziós közegét és elúciós feltételeit,** és igazoltam, hogy a 0,5 mg/ml koncentrációjú, vizes közegű alkalmazás nyújtja a legjobb teljesítményt, felülmúlva a kereskedelmi centrifugális amin-és amid-funkcionalizált oszlopos készleteket is.
4. **Megállapítottam, hogy a sclerosis multiplex betegségben a nem szerinti csoportosítás befolyásolja a teljes szérum N-glikán specifikus mintázatát** és ki-mutattam, hogy a fukoziláció és szializáció mértéke, valamint ezek kapcsolata nemi specifitást mutat.
5. **Megállapítottam, hogy a COVID-19 fertőzés esetében a fertőzés és a Pfizer-BioNTech mRNS-alapú vakcináció eltérő N-glikozilációs mintázatokat eredményez.** A szializáció mértékét a fertőzés és az oltottság együtt növelte, míg a fukoziláció mértékét csak az oltott betegek között befolyásolta a COVID-19 fertőzésen való átesettség.

- 6. Akut vakbélgyulladás gyermekpopulációban elsőként történt a teljes szérum N-glikánmintázat feltérképezése,** mely során megállapítottam olyan mono-, di- és tri-szialiszt glikánstruktúrákat, valamint küszöbértékeket, amelyek magas megbízhatósággal különítik el a vakbélgyulladással diagnosztizált betegek és egészséges kontrollok, valamint hasi fájdalommal diagnosztizált betegek csoportjait egymástól.

A bemutatott új tudományos eredmények hozzájárulnak a glikoziláció és a mágneses nanorészecskék alkalmazásának megértéséhez, és potenciálisan új lehetőségeket nyújtanak a diagnosztikai és terápiás stratégiák fejlesztésében.

7. Summary

Protein glycosylation is a critical post-translational modification reportedly altered in a wide range of pathological conditions including cancer and inflammation. Inflammatory immune responses are the mixtures of altered systemic physiological and biochemical processes. Pro-inflammatory cytokines can modulate the expression levels of glycosyl-transferases impacting on the biosynthesis of glycan chains resulting in altered glycosylation patterns on the glycoproteins. The importance of sialylation, fucosylation, galactosylation and terminal bisecting N-acetyl-glucosamine is identified in multiple immune reactions such as antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, complement activation and affinity to Fc γ receptors. Alterations of N-glycosylation were found to be associated with metabolic health, inflammatory markers and correlating with CRP. The analysis of the altered glycosylation patterns may improve the detection of inflammation in combination with current diagnostic methods. Due to the complexity and low abundance of glycan structures, their analysis requires high-resolution separation methods mostly liquid chromatography and capillary electrophoresis with fluorescence or mass-spectrometric detection.

This research had two primary aims, discussed in two main sections of the dissertation.

1. Development of an efficient, reproducible, and automatable N-glycan purification protocol using magnetic nanoparticles (MNPs).
2. The other goal of the study was to explore total serum N-glycosylation patterns in three different pathological conditioned inflammatory diseases - multiple sclerosis, COVID-19 and acute appendicitis.

In all experiment the glycans were released from serum samples PNGase F digestion followed by ProA fluorescence labeling, then a MNP-or functionalized centrifugal spin column-based enrichment. The prepared samples were analyzed by hydrophilic interaction based liquid chromatography coupled with fluorescence

detection and mass spectrometry (HILIC-UHPLC-FLD-MS). In order to quantify the relative area percentage under the curve (CAT%) or intensity, the individual glycan peaks integrated on the fluorescence chromatograms and confirmed by their $[m/z]^{2+}$ values from mass spectra.

During the optimization of MNP-based glycan purification protocol, four different amine-functionalized MNP types were compared in terms of glycan binding efficiency and reproducibility. Among these, $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNPs demonstrated superior performance, supported by their low coefficient of variation in CAT% values, high glycan peak intensities, and effective dye removal. Additionally, these findings were confirmed by applying the MNP-based protocol for high-throughput serum N-glycan analysis in multiple sclerosis samples. Further optimization identified the influence of MNP concentration and dispersion medium, as well as the efficiency of two elution buffers. The best performance was achieved with $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ MNPs at a concentration of 0.5 mg/ml in an aqueous medium, outperforming the other MNP variants and commercially available centrifugal column kits. This protocol was implemented into an automated platform with a Hamilton Microlab Prep Liquid Handler.

Investigation of total serum N-glycosylation patterns in three inflammatory diseases - multiple sclerosis (MS), COVID-19, and acute appendicitis - introducing new analytical perspectives and complementing existing literature data.

1. For MS, samples were analyzed in a gender-stratified manner. The current diagnostic practice for MS mainly relies on MRI and the detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid (CSF). The results presented in the thesis indicate that glycosylation alterations in MS show gender-specific patterns, particularly in the relationship between fucosylation and sialylation. Fucosylated and mono-sialylated or non-sialylated structures were significantly decreased, while afucosylated and its fucosylated, bisected counterpart were significantly increased in the MS_Female group.

2. In COVID-19, previous studies have mainly focused on associations between N-glycosylation changes and disease severity, progression, and acute immune responses, while the independent impact of vaccination and post-infection glycan patterns has been less investigated. Here, mRNA vaccination and SARS-CoV-2 infection resulted in distinct N-glycosylation patterns. Fucosylation and degree of sialylation emerged as the most characteristic marker. The afucosylated, disialylated structure was elevated in the Covid+Vaccinated+ group, whereas its fucosylated counterpart was decreased, indicating a biosynthetic link between fucosylated and afucosylated forms. The afucosylation reliably characterized the Covid+Vaccinated+ group, while the fucosylation identified the Covid-Vaccinated+ group by ROC analysis ($AUC > 0.7$). Sialylation levels were strongly associated with vaccination, particularly among previously infected individuals, supporting the conclusion that the Pfizer-BioNTech mRNA vaccine modulates serum N-glycan profiles compared to uninfected, unvaccinated controls.

3. In acute appendicitis, literature data indicate that several liver-synthesized acute-phase proteins, such as $\alpha 1$ -acid glycoprotein and $\alpha 1$ -antitrypsin, undergo pronounced N-glycosylation changes, particularly an increased presence of sialylated di-antennary structures during acute inflammation. Consistent with this, the present study found elevated proportions of di-, and tri-sialylated glycans in acute appendicitis, supporting its acute inflammatory nature. This work represents the first mapping of total serum N-glycosylation patterns in a pediatric appendicitis cohort, revealing strong diagnostic potential. Some of the main mono-, di- and tri-sialylated glycans showed strong correlations with disease presence. Mono-sialylated and bisected structures decreased, while the di- and tri-sialylated structures increased in appendicitis. Lower levels of neutral glycans and higher levels of sialylated structures contributed to clear separation of patient and control groups.

In conclusion, the MNP-based method developed in this dissertation provides a faster, simpler, and automatable alternative to conventional glycan purification techniques, enabling minimization of concentration steps and improving measurement accuracy. Furthermore, the analysis of total serum N-glycosylation patterns revealed clear disease-specific alterations across the three inflammatory conditions, offering valuable insights into their pathomechanisms and demonstrating potential as complementary diagnostic biomarkers.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni őszinte hálámat témavezetőmnek, Dr. Váradi Csaba egyetemi docensnek, aki tudásával és tapasztalatával segítette tudományos fejlődésemet. Kurzusokon, konferenciákon és személyes konzultációkon nyújtott iránymutatásával, valamint a cikkírás és a tudományos publikációs folyamat elsajátításában nyújtott támogatásával hozzájárult ahhoz, hogy a doktori fokozat megszerzéséig eljuthassak.

Köszönettel tartozom a Miskolci Egyetem Kémia Intézetének igazgatójának, Prof. Dr. Viskolcz Bélának, egyetemi tanárnak, amiért lehetőséget biztosított a doktori képzésemhez, és helyet adott a FIEK intézetében a munkatársak közösségében. Hálás vagyok a Kémia Intézetben dolgozó PhD hallgatótársamnak és témavezetőjének, amiért biztosították számomra a mágneses nanorészecskéket, amelyek kutatásom alapvető részét képezték, valamint mindazoknak a munkatársaimnak, akik akár tudományos, akár adminisztratív oldalról hozzájárultak kutatásaim előrehaladásához. Külön köszönet illeti a Doktori Iskola ügyintézőit, akik munkájukkal a doktori képzés adminisztratív terheit a kezdetektől a védésig jelentősen megkönnyítették. Továbbá köszönöm Dr. Szőri-Dorogházi Emma, egyetemi docensnek a négy éven át nyújtott lelkes és alapos bírálati észrevételeit, amelyek nagyban hozzájárultak kutatószemináriumi dolgozataim és így a disszertációm fejlődéséhez is.

Végezetül szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak a folyamatos támogatást, biztatást és türelmet, amellyel végigkísértek ezen az úton. Külön hálával tartozom kolléga-barátnőmnek, aki megértésével, humorával és bátorításával mindig képes volt felvidítani a nehezebb pillanatokban is. Köszönet a férjemet, aki megértésével, kedvességével és türelmével a teljes négy év során mellettem állt. Nemcsak mindennapi támogatásával segített, hanem a disszertáció írása során adott hasznos tanácsaival is hozzájárult munkámhoz.

9. Értekezéslet 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>

10. További, referált folyóiratokban megjelenő közlemények

[1] Dojcsák, D., & Váradi, C. (2024). N-glycosylation studies in infectious disease using high-resolution analytical methods. In XXX. *Nemzetközi Vegyészkonferencia* (p. 19).

[2] Dojcsák, D., & Váradi, C. (2024). Mágneses nanorészecske alapú glikán tisztítási protokoll optimalizálása: Hatékonyság és specificitás javítása mágneses nanorészecskék alkalmazásával. *Doktorandusz Almanach*, 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 folyadékkromatográfiával 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

11. További, nem referált folyóiratban megjelenő 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.

12. Irodalomjegyzék

1. Suzuki T, Cummings RD, Aebi M, Parodi A. Glycans in Glycoprotein Quality Control. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., eds. *Essentials of Glycobiology*. 4th ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022.529-538.
2. Varki, A., Biological roles of glycans. *Glycobiology*, 2016. **27**(1): p. 3-49.
3. 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.
4. Váradi, C., C. Lew, and A. Guttman, Rapid Magnetic Bead Based Sample Preparation for Automated and High Throughput N-Glycan Analysis of Therapeutic Antibodies. *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(12): p. 5682-5687.
5. Wan, C., et al., Cellulose functionalized magnetic beads for high throughput glycosylation analysis in biotherapeutic modalities. *Scientific Reports*, 2024. **14**(1): p. 29735.
6. Trbojević-Akmačić, I., et al., High-Throughput Glycomic Methods. *Chemical Reviews*, 2022. **122**(20): p. 15865-15913.
7. Pongracz, T., O.A. Mayboroda, and M. Wuhler, The Human Blood N-Glycome: Unraveling Disease Glycosylation Patterns. *JACS Au*, 2024. **4**(5): p. 1696-1708.
8. Murray, T.J., The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *Journal of the Neurological Sciences*, 2009. **277**: p. S3-S8.
9. 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.
10. Scheper, A.F., et al., Understanding glycosylation: Regulation through the metabolic flux of precursor pathways. *Biotechnol Adv*, 2023. **67**: p. 108184.
11. 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.
12. de Haan, N., M.I. Nielsen, and H.H. Wandall, Reading and Writing the Human Glycocode. *Annual Review of Biochemistry*, 2024. **93**(Volume 93, 2024): p. 529-564.
13. Visconti, P.E. and H.M. Florman, Mechanisms of Sperm-Egg Interactions: Between Sugars and Broken Bonds. *Science Signaling*, 2010. **3**(142): p. pe35-pe35.
14. Clerc, F., et al., Human plasma protein N-glycosylation. *Glycoconj J*, 2016. **33**(3): p. 309-43.
15. Fan, Y., et al., Loss and gain of N-linked glycosylation sequons due to single-nucleotide variation in cancer. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 4322.
16. Lux, A., et al., The pro and anti-inflammatory activities of immunoglobulin G. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2010. **69**: p. i92-i96.

17. Stanley P, Taniguchi N, Aeby M. N-glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., eds. *Essentials of Glycobiology*. 4th ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. p. 103-16.
18. Lopez-Perez, M., et al., Acquisition of Fc-afucosylation of PfEMP1-specific IgG is age-dependent and associated with clinical protection against malaria. *Nature Communications*, 2025. **16**(1): p. 237.
19. de Haan, N., et al., Glycomics studies using sialic acid derivatization and mass spectrometry. *Nature Reviews Chemistry*, 2020. **4**(5): p. 229-242.
20. Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., eds. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
21. Varki, A., et al., Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. *Glycobiology*, 2015. **25**(12): p. 1323-1324.
22. Thieker, D.F., et al., 3D implementation of the symbol nomenclature for graphical representation of glycans. *Glycobiology*, 2016. **26**(8): p. 786-787.
23. Struwe, W.B., et al., GlycoMob: an ion mobility-mass spectrometry collision cross section database for glycomics. *Glycoconj J*, 2016. **33**(3): p. 399-404.
24. Tiemeyer, M., et al., GlyTouCan: an accessible glycan structure repository. *Glycobiology*, 2017. **27**(10): p. 915-919.
25. Ceroni, A., et al., GlycoWorkbench: A Tool for the Computer-Assisted Annotation of Mass Spectra of Glycans. *Journal of Proteome Research*, 2008. **7**(4): p. 1650-1659.
26. Bladergroen, M.R., et al., Total plasma N-glycomic signature of SARS-CoV-2 infection. *iScience*, 2024. **27**(7): p. 110374.
27. Liao, C., et al., FUT8 and Protein Core Fucosylation in Tumours: From Diagnosis to Treatment. *Journal of Cancer*, 2021. **12**(13): p. 4109-4120.
28. Chen, Z., et al., Recognition of Core-Fucosylated Glycopeptides Based on the Y1+Fuc/Y1 Ratio in Low-Energy HCD Spectra. *Analytical Chemistry*, 2022. **94**(50): p. 17349-17353.
29. Lauc, G., Precision medicine that transcends genomics: Glycans as integrators of genes and environment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2016. **1860**(8): p. 1571-1573.
30. Dotz, V. and M. Wuhrer, N-glycome signatures in human plasma: associations with physiology and major diseases. *FEBS Letters*, 2019. **593**(21): p. 2966-2976.
31. Royle, L., et al., HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Analytical Biochemistry*, 2008. **376**(1): p. 1-12.
32. Knežević, A., et al., Variability, Heritability and Environmental Determinants of Human Plasma N-Glycome. *Journal of Proteome Research*, 2009. **8**(2): p. 694-701.
33. Reily, C., et al., Glycosylation in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 2019. **15**(6): p. 346-366.

34. Reiding KR, Blank D, Kuijper DM, Deelder AM, Wuhrer M. Serum protein N-glycosylation changes with rheumatoid arthritis disease activity during and after pregnancy. *Front Med.* 2017;4:2.
35. Mayboroda, O.A., et al., An Integrated Glycosylation Signature of Rheumatoid Arthritis. *Biomolecules*, 2023. **13**(7).
36. Clerc F, Novokmet M, Dotz V, et al. Plasma N-glycan signatures are associated with features of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2018;155(3):829-43.
37. Pongracz, T., et al., Autoimmune hepatitis displays distinctively high multi-antennary sialylation on plasma N-glycans compared to other liver diseases. *Journal of Translational Medicine*, 2024. **22**(1): p. 456.
38. 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.
39. Wuhrer, M., et al., Pro-inflammatory pattern of IgG1 Fc glycosylation in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroinflammation*, 2015. **12**(1): p. 235.
40. Thompson, A.J., et al., Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*, 2018. **17**(2): p. 162-173.
41. Cvetko, A., et al., Glycosylation Alterations in Multiple Sclerosis Show Increased Proinflammatory Potential. *Biomedicines*, 2020. **8**(10): p. 410.
42. Kennedy, P.G.E., et al., Aberrant Immunoglobulin G Glycosylation in Multiple Sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2022. **17**(1-2): p. 218-227.
43. Lai, Z., et al., Disease-Specific haptoglobin N-Glycosylation in inflammatory disorders between cancers and benign diseases of 3 types of female internal genital organs. *Clinica Chimica Acta*, 2023. **547**: p. 117420.
44. 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.
45. Reiding, K.R., et al., Human Plasma N-glycosylation as Analyzed by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance-MS Associates with Markers of Inflammation and Metabolic Health*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2017. **16**(2): p. 228-242.
46. Duarte-Rey, C., et al., IgM predominance in autoimmune disease: genetics and gender. *Autoimmun Rev*, 2012. **11**(6-7): p. A404-12.
47. Irvine, E.B. and G. Alter, Understanding the role of antibody glycosylation through the lens of severe viral and bacterial diseases. *Glycobiology*, 2020. **30**(4): p. 241-253.
48. 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.

49. Hiscott, J., et al., The global impact of the coronavirus pandemic. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2020. **53**: p. 1-9.
50. Bian, J. and Z. Li, Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2): SARS-CoV-2 receptor and RAS modulator. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2021. **11**(1): p. 1-12.
51. Ying, B., et al., Protective activity of mRNA vaccines against ancestral and variant SARS-CoV-2 strains. *Science Translational Medicine*, 2022. **14**(630): p. eabm3302.
52. Beimdiek, J., et al., Plasma markers of COVID-19 severity: a pilot study. *Respiratory Research*, 2022. **23**(1): p. 343.
53. Bye, A.P., et al., Aberrant glycosylation of anti-SARS-CoV-2 spike IgG is a prothrombotic stimulus for platelets. *Blood*, 2021. **138**(16): p. 1481-1489.
54. 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.
55. Xie, Y. and M. Butler, Serum N-glycomic profiling may provide potential signatures for surveillance of COVID-19. *Glycobiology*, 2022. **32**(10): p. 871-885.
56. Haroun, R.A.-H., W.H. Osman, and A.M. Eessa, Evaluation of serum total sialic acid in moderate COVID-19 patients with and without gastrointestinal tract manifestations. *Tissue and Cell*, 2022. **74**: p. 101679.
57. Pongracz, T., et al., Immunoglobulin G1 Fc glycosylation as an early hallmark of severe COVID-19. *eBioMedicine*, 2022. **78**.
58. Pongracz, T., G. Vidarsson, and M. Wuhrer, Antibody glycosylation in COVID-19. *Glycoconjugate Journal*, 2022. **39**(3): p. 335-344.
59. Sarrats, A., et al., Glycosylation of liver acute-phase proteins in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, 2010. **4**(4): p. 432-448.
60. Gornik, O. and G. Lauc, Glycosylation of Serum Proteins in Inflammatory Diseases. *Disease Markers*, 2008. **25**(4-5): p. 493-289.
61. Vreeker, G.C.M., et al., Automated Plasma Glycomics with Linkage-Specific Sialic Acid Esterification and Ultrahigh Resolution MS. *Analytical Chemistry*, 2018. **90**(20): p. 11955-11961.
62. Ruhaak, L.R., et al., Optimized Workflow for Preparation of APTS-Labeled N-Glycans Allowing High-Throughput Analysis of Human Plasma Glycomes using 48-Channel Multiplexed CGE-LIF. *Journal of Proteome Research*, 2010. **9**(12): p. 6655-6664.
63. Váradi, C., et al., The Analysis of Human Serum N-Glycosylation in Patients with Primary and Metastatic Brain Tumors. *Life*, 2021. **11**(1): p. 29.
64. van der Zon AAM, Hana LN, Husein H, Holmark T, Zhai Z, Gargano AFG. Hydrophilic Interaction Chromatography HRMS with Acrylamide Monolithic Columns: A Novel Approach for Intact Antibody Glycoform Characterization. *Anal Chem*. 2025;97(25):13569-13576.

65. Nicolardi, S., et al., Mapping O-glycosylation of apolipoprotein C-III in MALDI-FT-ICR protein profiles. *PROTEOMICS*, 2013. **13**(6): p. 992-1001.
66. Falck, D., et al., High-Throughput Analysis of IgG Fc Glycopeptides by LC-MS, in *High-Throughput Glycomics and Glycoproteomics: Methods and Protocols*, G. Lauc and M. Wuhrer, Editors. 2017, Springer New York: New York, NY. p. 31-47.
67. Piovesana, S., et al., Recent trends in glycoproteomics by characterization of intact glycopeptides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2023. **415**(18): p. 3727-3738.
68. Bones, J., et al., Ultra Performance Liquid Chromatographic Profiling of Serum N-Glycans for Fast and Efficient Identification of Cancer Associated Alterations in Glycosylation. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(24): p. 10208-10215.
69. Pučić, M., et al., High Throughput Isolation and Glycosylation Analysis of IgG–Variability and Heritability of the IgG Glycome in Three Isolated Human Populations *. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2011. **10**(10).
70. Ahn, J., et al., Separation of 2-aminobenzamide labeled glycans using hydrophilic interaction chromatography columns packed with 1.7 microm sorbent. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010. **878**(3-4): p. 403-8.
71. Neue, U.D., et al., Ultra-performance liquid chromatography technology and applications. *Adv Chromatogr*, 2010. **48**: p. 99-143.
72. Wilson, I.D., et al., High Resolution "Ultra Performance" Liquid Chromatography Coupled to oa-TOF Mass Spectrometry as a Tool for Differential Metabolic Pathway Profiling in Functional Genomic Studies. *Journal of Proteome Research*, 2005. **4**(2): p. 591-598.
73. Keser, T., et al., Comparison of 2-Aminobenzamide, Procainamide and RapiFluor-MS as Derivatizing Agents for High-Throughput HILIC-UPLC-FLR-MS N-glycan Analysis. *Frontiers in Chemistry*, 2018. **Volume 6 - 2018**.
74. Tarentino, A.L., C.M. Gomez, and T.H. Plummer, Jr., Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry*, 1985. **24**(17): p. 4665-4671.
75. Ruhaak, L.R., et al., Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010. **397**(8): p. 3457-3481.
76. Olajos, M., et al., Sample Preparation for the Analysis of Complex Carbohydrates by Multicapillary Gel Electrophoresis with Light-Emitting Diode Induced Fluorescence Detection. *Analytical Chemistry*, 2008. **80**(11): p. 4241-4246.
77. Váradi, C., et al., Quantitative twoplex glycan analysis using ¹²C₆ and ¹³C₆ stable isotope 2-aminobenzoic acid labelling and capillary electrophoresis

- mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016. **408**(30): p. 8691-8700.
78. Váradi, C., et al., Purification of Fluorescently Derivatized N-Glycans by Magnetic Iron Nanoparticles. *Nanomaterials*, 2019. **9**(10): p. 1480.
79. Selman, M.H.J., et al., Cotton HILIC SPE Microtips for Microscale Purification and Enrichment of Glycans and Glycopeptides. *Analytical Chemistry*, 2011. **83**(7): p. 2492-2499.
80. 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.
81. Nejati, K. and R. Zabihi, Preparation and magnetic properties of nano size nickel ferrite particles using hydrothermal method. *Chemistry Central Journal*, 2012. **6**(1): p. 23.
82. Lu, A.-H., E.L. Salabas, and F. Schüth, Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007. **46**(8): p. 1222-1244.
83. Butterworth, M.D., L. Illum, and S.S. Davis, Preparation of ultrafine silica- and PEG-coated magnetite particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2001. **179**(1): p. 93-102.
84. Mushtaq, M., et al., Polymer-coated CoFe₂O₄ nanoassemblies as biocompatible magnetic nanocarriers for anticancer drug delivery. *Journal of Materials Science*, 2017. **52**.
85. Häfeli, U., The History of Magnetism in Medicine, in *Magnetism in Medicine*. 2006. p. 1-25.
86. Stueber, D.D., et al., Magnetic Nanoparticles in Biology and Medicine: Past, Present, and Future Trends. *Pharmaceutics*, 2021. **13**(7): p. 943.
87. Su, Y.-H., et al., Removal of high-molecular-weight DNA by carboxylated magnetic beads enhances the detection of mutated K-ras DNA in urine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008. **1137**: p. 82-91.
88. Laurent, S., et al., Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews*, 2008. **108**(6): p. 2064-2110.
89. Wang, H., et al., Crop DNA extraction with lab-made magnetic nanoparticles. *PLoS One*, 2024. **19**(1): p. e0296847.
90. Lodha, A., et al., Isolation of PCR ready-human DNA using copper nanoparticles from skeletal remains. *Forensic Science International*, 2017. **270**: p. 146-152.
91. Gerzsenyi, T.B., et al., A Simplified and Efficient Method for Production of Manganese Ferrite Magnetic Nanoparticles and Their Application in DNA Isolation. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023. **24**(3): p. 2156.
92. English, P.A., et al., A case for the use of receiver operating characteristic analysis of potential clinical efficacy biomarkers in advanced renal cell carcinoma. *Future Oncol*, 2016. **12**(2): p. 175-82.

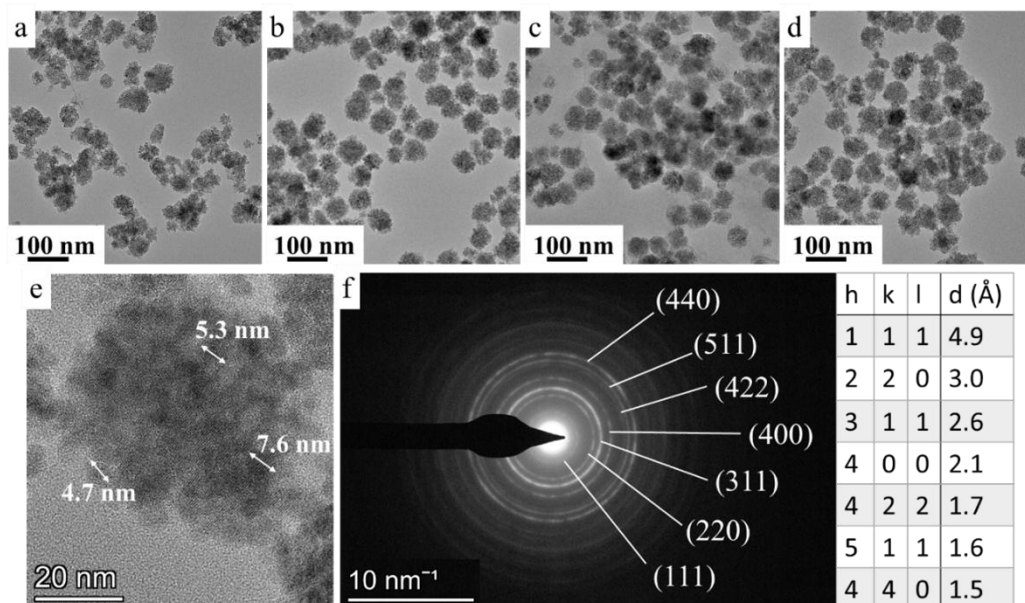
93. Dojcsák, D., et al., NH₂-Functionalized Magnetic Nanoparticles for the N-Glycomic Analysis of Patients with Multiple Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. **23**(16): p. 9095.

Mellékletek

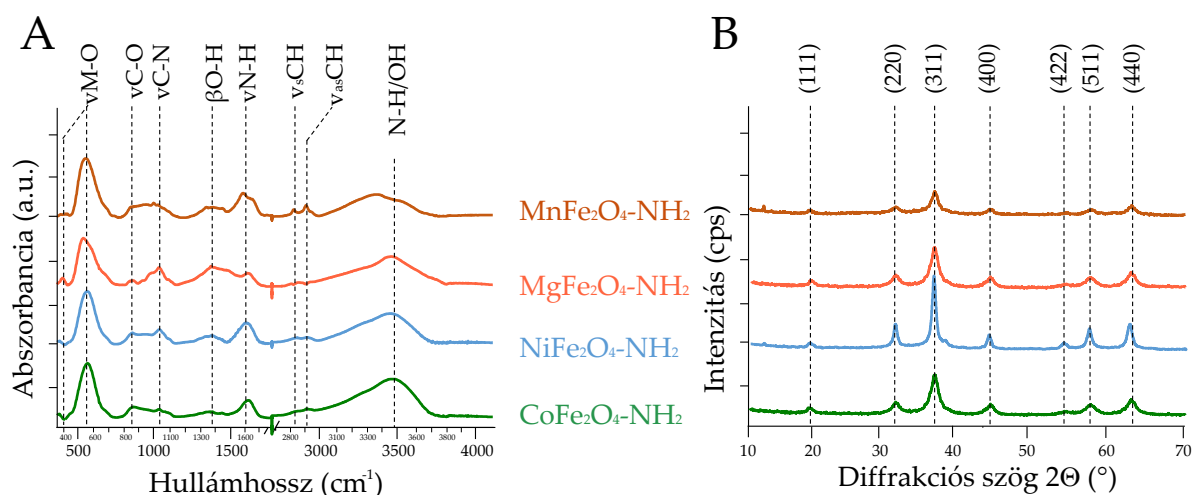
1. számú melléklet: Amin-funkcionalizált mágneses nanorészecske összehasonlítás N-glikán megkötési hatékonyságának szempontjából

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

és a glikánok hidroxil-csoportja között létrejövő kötés révén tud megvalósulni. Ennek alátámasztására a továbbiakban bemutatott eredmények szolgálnak.



1. ábra_1. sz. melléklet: TEM felvétel a $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (a), $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (b), $\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (c) $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ (d) nanorészecskékről és a NiFe_2O_4 nanorészecskének az elektron röntgendiffrakciós mintázata (XRD) (e), illetve a mért rácssík-távolság (d-spacing) értéke ångström ben (Å) megadva (f).



2. ábra_1. sz. melléklet: Amin-funkcionalizált ferrit alapú mágneses nanorészecskék FTIR (A) és XRD (B) analízisének eredménye.

A, ábra részletes magyarázata: A fém-oxid ($\nu_{\text{M-O}}$) spinális szerkezetében kötődő rezgések által 2 sávot azonosítottunk: a tetrahedrális komplexhez való kötődést $500\text{ cm}^{-1} - 600\text{ cm}^{-1}$

hullámhosszon, míg az oktahedrális komplexhez való kötődést 400 cm^{-1} - 450 cm^{-1} hullámhosszon értékeltük. A sávok az alábbi hullámhosszokon rendelkezhetők a $\text{Fe}^{3+}\text{--O}^{2-}$ A-rácsszerkezet rezgéseire: 581 cm^{-1} ($\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{--NH}_2$), 586 cm^{-1} ($\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{--NH}_2$), 567 cm^{-1} ($\text{MgFe}_2\text{O}_4\text{--NH}_2$) és 595 cm^{-1} ($\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{--NH}_2$). A spektrumokon 800 cm^{-1} és 900 cm^{-1} között megjelenő sáv az etilén glikolról származó alkohol csoport $\nu\text{C--O}$ kötési rezgését jelenti. A ferritek felületén adszorbeálódó etanolamin molekulákból származó NH_2 funkciós csoportok ($\nu\text{C--N}$) 1050 cm^{-1} és 1630 cm^{-1} hullámhossz között jelennek meg. Az alacsony intenzitású sávok 1370 cm^{-1} és 1410 cm^{-1} hullámhosszon hidroxil csoportokat jelezhet (βOH). Az alifás és aromás C-H kötésekől származó szimmetrikus és asszimmetrikus kötési rezgések két apró rezgésként jelentkeznek 2850 cm^{-1} and 2930 cm^{-1} hullámhossz körül. Ezek a sávok a részecskék felületén lévő etilén-glikol és etanol-amin származékok következményei lehetnek. 3000 cm^{-1} - 3750 cm^{-1} közötti adszorpciós sávok hidroxil és amin csoportoknak a kötési rezgéseit jelentik. B, ábra részletes magyarázata: a 4 amin funkcionizált ferrit nanorészecske XRD analízise során 7 reflexiós csúcsot azonosítottunk: $18,4^\circ$ (111), $30,1^\circ$ (220), $35,4^\circ$ (311), $43,1^\circ$ (400), $53,3^\circ$ (422), $56,8^\circ$ (511) és $62,5^\circ$ (440) két Theta-fok, amelyek alátámasztják a CoFe_2O_4 , NiFe_2O_4 , MgFe_2O_4 és MnFe_2O_4 spinellszerkezetének jelenlétét (PDF 22-1086; PDF: 54-0964; PDF 36-0398 és PDF 74-2403).

1. táblázat_1. sz. melléklet: A ferrit nanorészecskék széntartalma, fajlagos felülete és átlagos részecskemérete (XRD alapján).

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

2. táblázat_1. sz. melléklet: N-glikán mintaelőkészítésben alkalmazott pufferek, oldatok elkészítése, feltüntetve az adott puffer alkalmazási területével

Puffer neve	Elkészítés, recept	Alkalmazási terület
-------------	--------------------	---------------------

95 (v/v)% ACN	95/15 (v/v)%-os ACN/50 mM ammónium-formiát (pH 4,4) puffer elkészítése 1 l végtérfogatra	MNP-protokoll és MonoSpin oszlopos protokoll mosó puffer
150 mM ammónium-formiát puffer	9,46 g ammónium-formiátot 800 ml Milli-Q vízben oldottam, majd a pH-t 4,4 értékre állítottam LC-MS minőségű 25 (v/v)%-os Ammónia oldattal (kb. 4 ml) és kiegészítettem a végtérfogatot 1 l-re.	MonoSpin oszlopos készlet és MNP-protokoll elúciós puffere
1 (v/v)% hangyasav puffer	400 ml Milli-Q vízbe 5 ml formiát savat adtam, kevertettem majd kiegészítettem a végtérfogatot 500 ml-re.	MonoSpin oszlopos készlet elúciós puffer1
50 mM ammónium-formiát (pH 4,4) puffer	1,886 ml LC-MS minőségű hangyasavat adtam 800 ml Milli-Q vízhez, majd LC-MS minőségű 25 (v/v)%-os Ammónia oldattal (kb. 4 ml) beállítottam az oldat pH-ját 4,4 értékre Végtérfogatot kiegészítettem 1 l-re.	HILIC-UHPLC elválasztás puffere

3. táblázat_1. sz. melléklet: Az automatizálási parancsok sorrendje a Hamilton MicroLab Prep szoftver alapján

1. 180 µl MNP-oldat kimérése a PCR-plate-be (3. számú melléklet, 3. oldal)
2. 170 µl 100%-os AcN hozzáadása a PCR-plate cukormintákat tartalmazó pozíciókba (3. számú melléklet, 4. oldal)
3. PCR-plate mágnesre helyezése és 1 perc várakozás
4. MNP-oldatról 180 µl felülúszó eltávolítása
5. PCR-plate mágneses állványról való levétele
6. 200 µl AcN-ben oldott cukorminta átmérése az MNP-t tartalmazó pozíciókba (3. számú melléklet 4. oldal)
7. 1 perc várakozás
8. PCR-plate mágnesre helyezése és 1 perc várakozás
9. MNP-oldatról 200 µl felülúszó eltávolítása

10. PCR-plate mágneses állványról való levétele
11. 200 µl Mosó oldat (90% AcN) hozzáadása az MNP-t tartalmazó pozíciókba
(3. számú melléklet 5. oldal)
12. 1 perc várakozás
13. PCR-plate mágnesre helyezése és 1 perc várakozás
14. MNP-oldatról 200 µl felülúszó eltávolítása
15. PCR-plate mágneses állványról való levétele
16. 50 µl Elúciós puffer (150 mM ammónium-formiát, pH 4,4) hozzáadása az
MNP-t tartalmazó pozíciókba (3. számú melléklet 5. oldal)
17. 1 perc várakozás
18. PCR-plate mágnesre helyezése és 1 perc várakozás
19. MNP-oldatról 50 µl eluátum átmérése új pozíciókba a PCR-plate-n belül (3.
számú melléklet 5-6. oldal)

4. táblázat_1. sz. melléklet: Az amin-funkcionalizált mágneses nanorészecskék (MNP) négy különböző típusának glikánok tisztítására való alkalmasságának értékelése a kromatogramok integrálása alapján meghatározott csúcsintenzitások összehasonlítása alapján

MNP Csúcs neve	Csúcsintenzitás [EU] átlaga $\pm$ szórás			
	CoFe ₂ O ₄ -NH ₂	MnFe ₂ O ₄ -NH ₂	MgFe ₂ O ₄ -NH ₂	NiFe ₂ O ₄ -NH ₂
SZFF	170912228 $\pm$ 8051808	145035157 $\pm$ 34129061	123834574 $\pm$ 46053024	42666161 $\pm$ 21733705
#1	1076225 $\pm$ 388632	2011286 $\pm$ 776723	1488929 $\pm$ 358973	1871810 $\pm$ 567129
#2	346055 $\pm$ 122374	667821 $\pm$ 293825	409171 $\pm$ 109616	577786 $\pm$ 133721
#3	197078 $\pm$ 73656	393405 $\pm$ 160372	270611 $\pm$ 67410	353963 $\pm$ 99937
#4	1412119 $\pm$ 529646	2906959 $\pm$ 1227072	2025505 $\pm$ 525093	2808804 $\pm$ 833879
#5	733035 $\pm$ 279993	1523226 $\pm$ 617815	1089757 $\pm$ 286693	1513613 $\pm$ 462393
#6	348885 $\pm$ 135696	746539 $\pm$ 325931	510533 $\pm$ 134548	702254 $\pm$ 199754
#7	366679 $\pm$ 140442	795842 $\pm$ 384352	426337 $\pm$ 154327	688737 $\pm$ 191067
#8	654258 $\pm$ 250188	1339885 $\pm$ 629867	837804 $\pm$ 290238	1153784 $\pm$ 322047
#9	1594039 $\pm$ 590268	3671701 $\pm$ 1543820	2473712 $\pm$ 715962	3682897 $\pm$ 1085984
#10	299894 $\pm$ 109943	713629 $\pm$ 346287	451930 $\pm$ 145059	658237 $\pm$ 170003
#11	177804 $\pm$ 60115	501028 $\pm$ 215537	350201 $\pm$ 117728	507067 $\pm$ 126810
#12	2790017 $\pm$ 787891	7501270 $\pm$ 3340854	4957145 $\pm$ 1686693	7168564 $\pm$ 1667053
#13	1227146 $\pm$ 324703	3533256 $\pm$ 1522058	2309612 $\pm$ 758693	3486828 $\pm$ 890919
#14	665024 $\pm$ 177493	2027547 $\pm$ 914197	1402285 $\pm$ 460232	2114826 $\pm$ 434781
#15	7030588 $\pm$ 1830971	22252050 $\pm$ 9596691	15204422 $\pm$ 4995758	22566174 $\pm$ 4425907
#16	285756 $\pm$ 89471	879107 $\pm$ 415907	573092 $\pm$ 217343	838478 $\pm$ 194729
#17	713800 $\pm$ 182424	2409167 $\pm$ 1095033	1542111 $\pm$ 537342	2335683 $\pm$ 493367
#18	343177 $\pm$ 90600	1203944 $\pm$ 565939	764588 $\pm$ 281191	1143452 $\pm$ 236115
#19	513331 $\pm$ 145385	1657894 $\pm$ 746579	1109910 $\pm$ 438758	1540201 $\pm$ 340351
#20	351917 $\pm$ 108672	1160078 $\pm$ 521805	780791 $\pm$ 314024	1086226 $\pm$ 222422
#21	222214 $\pm$ 72646	750744 $\pm$ 351136	504036 $\pm$ 218304	680463 $\pm$ 142551
#22	109776 $\pm$ 44616	457435 $\pm$ 226878	312435 $\pm$ 137234	415631 $\pm$ 73893
#23	914202 $\pm$ 285663	3586834 $\pm$ 1540237	2359251 $\pm$ 839701	3395752 $\pm$ 631124
#24	110445 $\pm$ 45587	454517 $\pm$ 225260	306532 $\pm$ 143877	404610 $\pm$ 73800
#25	372750 $\pm$ 129092	1528878 $\pm$ 664882	992303 $\pm$ 370737	1462530 $\pm$ 252058
#26	507279 $\pm$ 167057	2044179 $\pm$ 890543	1331530 $\pm$ 492848	1925727 $\pm$ 354538

2. számú melléklet: Teljes szérum N-glikozilációs vizsgálatok különböző patológiai gyulladásos folyamatokban

1. táblázat_2. sz. melléklet: Sclerosis multiplex és kontroll mintacsoportok TSNG analízis statisztikai eredményei.

Glikánstruktúra neve#x [Elméleti m/z]²⁺ (#x: glikán csúcs sorszáma a fluoreszcens kromatogramon), retenciós idő [perc], átlag CAT% -és standard deviáció mintacsoportonként, Shapiro-Wilk normalitás teszt beteg és kontroll csoportra osztva nézve (konfidencia-intervallum: 95%), Kruskal-Wallis szignifikáns különbségek keresésére: kontroll és sclerosis multiplex mintacsoportok összehasonlítása nemek szerinti csoportosításban (konfidencia-intervallum: 95%, $p=0,05$).

Glikánstruktúra neve#x [Elméleti m/z] ²⁺	Reten- ciós idő [min] #x	Átlag CAT% (C_F)	Std. dev.	Átlag CAT% (C_N)	Std. dev.	Átlag CAT% (SM_F)	Std. dev.	Átlag CAT% (SM_N)	Std. dev.	Shapiro-Wilk Normalitás teszt	Kruskal- Wallis teszt (* $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$;
FA2#1 [841,94] ²⁺	16,07 #1	3,88	1,26	3,41	1,13	3,67	1,40	2,83	0,98	0,043	*0,04
M5#2 [727,89] ²⁺	17,29 #2	0,97	0,20	1,00	0,26	0,87	0,16	1,15	0,33	0,000	*0,04
FA2B#3 [943,48] ²⁺	17,55 #3	0,89	0,30	0,88	0,30	0,86	0,22	0,82	0,27	0,003	0,82
FA2(6)G1#4 [922,97] ²⁺	19,04 #4	3,65	1,15	3,60	0,77	3,45	1,10	3,11	0,77	0,065	0,24
FA2(3)G1#5 [922,97] ²⁺	19,47 #5	1,74	0,47	1,61	0,41	1,49	0,61	1,42	0,41	0,129	0,27
FA2(6)BG1#6 [1024,51] ²⁺	20,14 #6	0,92	0,19	1,03	0,20	0,97	0,26	1,05	0,24	0,560	0,42
FA2(3)BG1#7 [1024,51] ²⁺	20,56 #7	0,34	0,12	0,30	0,13	0,27	0,06	0,31	0,10	0,322	0,33
M6#8 [808,91] ²⁺	20,64 #8	0,93	0,20	0,98	0,30	0,89	0,24	1,22	0,39	0,001	*0,02
A2G2#9 [930,97] ²⁺	20,94 #9	0,91	0,14	0,96	0,14	1,02	0,08	1,12	0,13	0,303	**0,01
FA2G2#10 [1003,92] ²⁺	22,27 #10	3,21	1,01	3,52	1,02	2,96	0,82	3,13	0,86	0,127	0,58
FA2BG2#11	22,98	0,71	0,18	0,76	0,18	0,76	0,18	1,10	0,24	0,029	**0,01

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

[1550,17] ²⁺	#32										
FA4G3S2#33	33,21	0,83	0,15	0,84	0,11	0,89	0,17	0,88	0,13	0,565	0,67
[1579,12] ²⁺	#33										
FA3G3S3#34	33,64	0,46	0,16	0,48	0,16	0,42	0,14	0,45	0,20	0,000	0,72
[1623,20] ²⁺	#34										
A3G3S3#35	34,11	1,65	0,30	1,90	0,62	1,54	0,63	1,75	0,47	0,142	0,43
[1550,18] ²⁺	#35										
FA3G3S3#36	34,21	2,80	0,94	2,44	0,93	3,12	1,47	2,72	1,31	0,015	0,52
[1623,20] ²⁺	#36										
A4G4S2#37	34,59	0,83	0,24	0,83	0,14	0,94	0,35	1,01	0,19	0,491	**0,01
[1587,19] ²⁺	#37										
A4G4S3#38	35,66	0,62	0,12	0,63	0,11	0,62	0,11	0,60	0,15	0,608	0,73
[1732,74] ²	#38										
A4G4S4#39	36,07	0,58	0,24	0,60	0,18	0,63	0,27	0,56	0,19	0,058	0,62
[1878,21] ²⁺	#39										
nem azonosított	36,78	0,22	0,06	0,22	0,04	0,20	0,06	0,19	0,07	0,019	0,08
	#40										
A4G4S4#41	36,95	0,55	0,17	0,53	0,11	0,52	0,15	0,47	0,11	0,137	0,22
[1878,21] ²⁺	#41										
A4G4S4#42	37,10	0,32	0,09	0,29	0,07	0,35	0,11	0,31	0,09	0,574	0,41
[1878,21] ²⁺	#42										
FA4G4S3#43	37,99	0,48	0,13	0,39	0,13	0,46	0,16	0,40	0,19	0,387	0,22
[1805,69] ²⁺	#43										

2. táblázat_2. sz. melléklet: COVID-19 kohorton elvégzett TSNG analízis statisztikai eredményei.

Glikánstruktúra neve#x [Elméleti m/z]²⁺ (#x: glikán csúcs sorszáma a fluoreszcens kromatogramon), retenciós idő [perc], átlag CAT% -és standard deviáció mintacsoportonként, Shapiro-Wilk normalitás teszt beteg és kontroll csoportra osztva nézve (konfidencia-intervallum: 95%), Kruskal-Wallis teszt szignifikancia szintjei (konfidencia-intervallum: 95%, p=0,05). C-O-: Covid-Oltás- mintacsoport; C-O+: Covid-Oltás+ mintacsoport; C+O-: Covid+Oltás- mintacsoport; C+O+: Covid+Oltás+ mintacsoport

Glikánstruktúra neve#x [Elméleti m/z] ²⁺	Retenciós idő [perc] #x	Átlag CAT% (C-O-)	Std. dev.	Átlag CAT% (C-O+)	Std. dev.	Átlag CAT% (C+O-)	Std. dev.	Átlag CAT% (C+O+)	Std. dev.	Shapiro- Wilk Nor- malitás teszt	Kruskal- Wallis (*p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001)
FA2#1 [841,94] ²⁺	13,30 #1	4,29	2,02	3,73	1,09	3,88	1,12	3,63	1,55	0,046	0,794

M5#2 [727,89] ²⁺	14,67 #2	2,55	0,86	2,49	0,43	2,33	0,45	2,20	0,54	0,001	0,361
FA2G1#3 [922,97] ²⁺	16,45 #3	3,64	0,93	3,74	0,88	3,62	0,61	3,37	0,97	0,041	0,500
FA2G1#4 [922,97] ²⁺	16,91 #4	1,73	0,58	1,82	0,48	1,62	0,23	1,62	0,37	0,049	0,701
FA2BG1#5 [1024,51] ²⁺	17,57 #5	1,33	0,36	1,38	0,27	1,24	0,32	1,20	0,30	0,104	0,575
M6#6 [808,92] ²⁺	18,19 #6	1,34	0,41	1,47	0,28	1,26	0,26	1,25	0,34	0,032	0,128
A2G2#7 [930,97] ²⁺	18,57 #7	1,15	0,33	1,27	0,21	1,28	0,26	1,20	0,17	0,431	0,716
A2BG2#8 [1032,51] ²⁺	19,43 #8	0,51	0,12	0,53	0,09	0,59	0,17	0,50	0,10	0,046	0,336
FA2G2#9 [1004,00] ²⁺	20,09 #9	3,04	0,84	3,54	1,07	2,93	0,51	2,93	0,81	0,001	0,208
FA2BG2#10 [1105,54] ²⁺	20,82 #10	2,33	0,36	2,43	0,27	2,30	0,37	2,18	0,34	0,894	0,320
FA2G2S1#11 [1149,55] ²⁺	21,94 #11	0,40	0,09	0,44	0,07	0,42	0,05	0,39	0,10	0,370	0,132
A2G2S1#12 [1076,52] ²⁺	22,28 #12	2,94	0,67	3,09	0,52	3,04	0,31	3,03	0,51	0,670	0,991
A2G2S1#13 [1076,52] ²⁺	22,47 #13	9,43	1,26	9,85	1,10	10,29	1,09	9,64	0,87	0,104	0,202
A2FG2S1#14 [1149,55] ²⁺	23,58 #14	0,69	0,44	0,56	0,24	0,71	0,27	0,56	0,20	0,001	0,224
FA2G2S1#15 [1149,55] ²⁺	23,88 #15	4,48	0,91	4,86	0,74	4,63	0,80	4,61	0,76	0,202	0,661
FA2BG2S1#16 [1251,09] ²⁺	24,41 #16	0,60	0,10	0,64	0,13	0,68	0,18	0,63	0,14	0,715	0,246
A2G2S2#17 [1222,06] ²⁺	24,73 #17	2,82	0,66	3,28	0,70	3,02	1,19	2,90	0,65	0,154	0,229
FA2BG2S1#18 [1251,08] ²⁺	24,89 #18	2,21	0,48	2,08	0,73	2,29	0,84	2,06	0,76	0,003	0,737
FA2BG2S1#19 [1251,08] ²⁺	25,30 #19	0,57	0,12	0,65	0,08	0,54	0,07	0,53	0,15	0,373	*0,013
FA2BG2S1#20 [1251,08] ²⁺	25,91 #20	0,45	0,05	0,44	0,06	0,48	0,07	0,47	0,06	0,070	0,328
A2G2S2#21 [1222,06] ²⁺	26,30 #21	29,88	2,38	29,08	2,14	29,68	2,48	30,02	1,75	0,486	0,657
A2G2S2#22 [1222,06] ²⁺	26,65 #22	1,11	0,21	1,24	0,17	1,08	0,15	1,22	0,12	0,793	*0,027

FA2G2S2#23 [1295,09] ²⁺	27,33 #23	0,55	0,17	0,48	0,13	0,65	0,21	0,37	0,14	0,019	***0,001
FA2G2S2#24 [1295,09] ²⁺	27,58 #24	4,09	0,95	3,83	0,94	4,10	0,97	4,28	0,96	0,003	0,545
FA2BG2S2#25 [1396,63] ²⁺	28,07 #25	2,38	0,51	2,20	0,55	2,43	0,60	2,33	0,53	0,482	0,620
A3G3S2#26 [1404,63] ²⁺	28,66 #26	1,59	0,40	1,75	0,41	1,77	0,57	1,86	0,35	0,085	0,313
A3G3S2#27 [1404,63] ²⁺	29,02 #27	0,20	0,07	0,22	0,06	0,21	0,05	0,28	0,18	0,001	0,334
A3G3S2#28 [1404,63] ²⁺	30,03 #28	0,92	0,24	1,02	0,28	0,97	0,25	1,10	0,30	0,261	0,213
A3G3S2#29 [1404,63] ²⁺	30,03 #29	0,54	0,25	0,43	0,09	0,44	0,13	0,57	0,21	0,001	0,177
FA3G3S2#30 [1477,66] ²⁺	30,58 #30	1,14	0,25	1,16	0,22	1,17	0,23	1,10	0,28	0,530	0,969
FA3G3S2#31 [1477,66] ²⁺	31,09 #31	0,38	0,06	0,37	0,08	0,36	0,05	0,42	0,14	0,001	0,122
A3G3S3#32 [1550,18] ²⁺	31,94 #32	4,33	1,08	4,17	1,22	4,54	1,75	5,01	0,99	0,267	0,174
A3G3S3#33 [1550,18] ²⁺	32,28 #33	0,32	0,09	0,33	0,08	0,30	0,08	0,35	0,09	0,007	0,349
A4G4S2#34 [1587,20] ²⁺	32,67 #34	0,33	0,09	0,34	0,10	0,28	0,09	0,39	0,12	0,621	*0,027
A4G4S2#35 [1587,20] ²⁺	32,87 #35	0,44	0,13	0,41	0,14	0,43	0,14	0,53	0,20	0,001	0,165
A3G3S3#36 [1550,18] ²⁺	33,35 #36	1,53	0,38	1,28	0,31	1,31	0,40	1,69	0,52	0,025	*0,045
A3FG3S3#37 [1623,21] ²⁺	33,62 #37	2,23	0,89	2,05	0,69	1,91	0,88	1,97	0,55	0,049	0,454
A3G3S3#38 [1550,18] ²⁺	34,12 #38	0,76	0,24	0,71	0,22	0,66	0,16	0,96	0,25	0,152	**0,009
A4G4S3#39 [1155,50] ²⁺	34,37 #39	0,25	0,14	0,20	0,09	0,18	0,11	0,17	0,09	0,087	0,253
A4G4S3#40 [1155,50] ²⁺	35,39 #40	0,29	0,09	0,22	0,08	0,20	0,05	0,30	0,10	0,018	***0,001
A4G4S4#41 [1252,53] ²⁺	35,57 #41	0,27	0,10	0,23	0,16	0,18	0,07	0,20	0,08	0,001	*0,049

3. táblázat_2. sz. melléklet: Appendicitis kohorton elvégzett TSNG analízis statisztikai eredményei.

Glikánstruktúra neve#x [Elméleti m/z]²⁺ (#x: glikán csúcs sorszáma a fluoreszcens kromatogramon), retenciós idő [perc], átlag CAT% -és standard deviáció mintacsoportonként, Shapiro-Wilk teszt egész mintaszetre nézve (konfidencia-intervallum: 95%), Mann-Whitney U-teszt_A/K csoportok között (konfidencia-intervallum: 99%, p=0,01), Kruskal-Wallis teszt A/NK/HK között (konfidencia-intervallum: 99%, p=0,01). A: Appendicitis mintacsoport, K: összes kontrollt tartalmazó mintacsoport, NK: normál kontroll mintacsoport, HK: hasfájós kontroll mintacsoport

Glikánstruktúra neve#x [Elméleti m/z] ²⁺	Retenciós idő [perc] #x	CAT% (A)	Std. dev.	CAT% (K)	Std. dev.	CAT% (NK)	Std. dev.	CAT% (HK)	Std. dev.	Shapiro-Wilk (*p<0,05; **p<0,01)	Mann- Whitney A/K (**p<0,01; ***p<0,001)	Kruskal- Wallis A/NK/HK (**p<0,01; ***p<0,001)
FA2#1 [841,94] ²⁺	15,06 #1	4,15	1,94	4,47	1,11	4,50	1,07	4,37	1,29	**1,47E-04	0,04	0,111
M5#2 [727,89] ²⁺	16,13 #2	1,02	0,37	0,85	0,17	0,83	0,17	0,90	0,18	**6,50E-07	0,01	0,025
FA2B#3 [943,48] ²⁺	16,35 #3	0,73	0,28	0,89	0,23	0,90	0,25	0,85	0,18	*1,19E-02	**0,001	**0,006
FA2G1#4 [922,97] ²⁺	17,58 #4	3,67	1,32	4,28	0,87	4,20	0,86	4,54	0,89	*1,71E-02	**0,006	0,016
FA2G1#5 [922,97] ²⁺	17,95 #5	1,49	0,60	1,79	0,51	1,71	0,43	2,03	0,68	**1,95E-03	**0,004	**0,009
FA2BG1#6 [1024,51] ²⁺	18,60 #6	0,71	0,26	0,84	0,21	0,81	0,19	0,93	0,27	2,22E-02	**0,005	0,013
FA2BG1#7 [1024,51] ²⁺	18,64 #7	0,40	0,13	0,30	0,07	0,29	0,07	0,31	0,07	**3,06E-06	***<0,001	***<0,001
M6#8 [808,91] ²⁺	19,02 #8	0,95	0,33	0,86	0,20	0,84	0,19	0,92	0,20	**4,55E-06	0,27	0,38
A2G2#9 [930,97] ²⁺	19,32 #9	1,03	0,28	1,39	0,22	1,41	0,23	1,30	0,19	1,52E-01	***<0,001	***<0,001
A2BG2#10 [1032,51] ²⁺	19,95 #10	0,20	0,05	0,20	0,05	0,19	0,05	0,23	0,06	7,26E-01	0,92	0,24
A2G1S1#11 [995,49] ²⁺	20,15 #11	0,30	0,12	0,26	0,08	0,25	0,08	0,30	0,07	*1,25E-02	0,14	0,09
FA2G2#12 [1003,92] ²⁺	20,32 #12	2,95	0,93	3,94	0,84	3,84	0,82	4,28	0,86	6,02E-01	***<0,001	***<0,001

A2G2S1#13 [1076,51] ²⁺	20,86 #13	0,62	0,21	0,72	0,28	0,71	0,28	0,74	0,27	6,60E-02	0,12	0,24
FA2BG2#14 [1105,53] ²⁺	20,95 #14	0,61	0,23	0,66	0,24	0,66	0,25	0,65	0,20	1,32E-01	0,26	0,52
M4G1S1#15 [974,97] ²⁺	21,11 #15	0,73	0,17	0,89	0,13	0,87	0,12	0,96	0,15	7,77E-01	***<0,001	***<0,001
M7#16 [889,94] ²⁺	21,35 #16	0,13	0,05	0,18	0,07	0,19	0,07	0,17	0,05	**1,34E-03	**0,001	**0,005
M7#17 [889,94] ²⁺	21,83 #17	0,12	0,03	0,19	0,04	0,19	0,04	0,18	0,02	2,13E-01	***<0,001	***<0,001
A2G2S1#18 [1076,51] ²⁺	22,30 #18	12,38	2,59	13,11	1,01	13,27	0,99	12,59	0,93	**5,05E-10	0,07	0,06
A2G2S1#19 [1076,51] ²⁺	22,44 #19	0,25	0,06	0,55	0,09	0,55	0,09	0,58	0,04	**1,44E-05	***<0,001	***<0,001
A2FG2S1#20 [1149,54] ²⁺	23,25 #20	4,09	0,93	5,19	0,70	5,11	0,67	5,46	0,76	3,60E-01	***<0,001	***<0,001
FA2G2S2#21 [1295,09] ²⁺	23,66 #21	0,62	0,16	0,74	0,13	0,74	0,13	0,72	0,16	2,17E-01	**0,001	**0,004
A2G2S2#22 [1222,06] ²⁺	23,98 #22	5,26	0,68	5,09	0,72	5,06	0,75	5,16	0,64	6,97E-01	0,34	0,59
M8#23 [970,88] ²⁺	24,22 #23	0,15	0,06	0,22	0,08	0,22	0,08	0,23	0,10	*3,81E-03	***<0,001	**0,001
FA2G2S2#24 [1295,09] ²⁺	24,76 #24	0,28	0,09	0,40	0,07	0,40	0,07	0,40	0,04	4,66E-01	***<0,001	***<0,001
A2G2S2#25 [1222,06] ²⁺	25,12 #25	34,95	3,90	29,61	1,94	29,52	1,77	29,91	2,51	*1,56E-02	***<0,001	***<0,001
FA2G2S2#26 [1295,09] ²⁺	25,75 #26	0,71	0,29	1,09	0,23	1,07	0,23	1,14	0,21	**7,54E-04	***<0,001	***<0,001
FA2G2S2#27 [1295,09] ²⁺	25,97 #27	3,16	0,64	3,28	0,87	3,31	0,95	3,19	0,53	**6,10E-07	0,84	0,98
FA2BG2S2#28 [1396,63] ²⁺	26,34 #28	0,89	0,30	1,09	0,30	1,02	0,23	1,34	0,36	*2,24E-02	**0,002	**0,001
A2BG3S2#29 [1404,63] ²⁺	26,61 #29	1,37	0,34	1,77	0,32	1,81	0,33	1,61	0,27	1,12E-01	***<0,001	***<0,001
A2BG3S2#30 [1404,63] ²⁺	26,92 #30	0,24	0,08	0,23	0,03	0,22	0,03	0,24	0,04	**1,73E-04	0,87	0,74
A2BG3S2#31 [1404,63] ²⁺	27,75 #31	0,72	0,23	1,45	0,33	1,49	0,34	1,29	0,22	**2,52E-03	***<0,001	***<0,001
FA3G3S2#32 [1477,65] ²⁺	27,83 #32	0,44	0,15	0,58	0,20	0,59	0,22	0,53	0,14	**1,14E-02	**0,002	**0,007
A3G3S3#33 [1550,17] ²⁺	28,05 #33	0,56	0,29	0,65	0,17	0,66	0,19	0,62	0,10	**2,62E-04	0,03	0,07

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