



Tudományos Diákköri Dolgozat

# Nagyérzékenységű jelölésmentes optikai bioszenzor kismolekulák kinetikai kölcsönhatásainak feltérképezésére

Készítette:

**Borbély Krisztina**

Egészségügyi mérnök MSc hallgató

**Belső konzulens:**

**Dr. Bonyár Attila**

Egyetemi docens, Elektronikai Technológia Tanszék  
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

**Külső konzulens:**

**Dr. Horváth Róbert**

Tudományos főmunkatárs, csoportvezető  
EK MFA, Nanobioszenzorika Laboratórium

**Dr. Kovács Boglárka**

Tudományos munkatárs  
EK MFA, Nanobioszenzorika Laboratórium

2023  
BUDAPEST

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>Kivonat .....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>5</b>
<b>Rövidítések.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Bevezetés.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Szakirodalmi áttekintés .....</b>	<b>8</b>
2.1 <i>Optikai bioszenzorok.....</i>	8
2.1.1 A GCI bioszenzor felépítése.....	9
2.1.2 A GCI bioszenzor működési elve.....	10
2.1.3 Hagymányos és RAPID kinetika összehasonlítása .....	12
2.2 <i>Glikoproteinek.....</i>	13
2.2.1 Fetuin glikoprotein .....	16
2.2.2 PNGáz F enzim .....	16
2.3 <i>FtsZ fehérje .....</i>	17
2.4 <i>NCR peptidek .....</i>	18
<b>3. Célkitűzés.....</b>	<b>20</b>
<b>4. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>21</b>
4.1 <i>Kísérlethez használt anyagok.....</i>	21
4.2 <i>Kötéskémiához használt reagensek készítése .....</i>	21
4.3 <i>Immobilizációhoz használt KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-oldat készítése .....</i>	22
4.4 <i>Kálium-foszfát-mérőpuffer készítése .....</i>	22
4.5. <i>Acetazolamid, mint kontroll molekula.....</i>	23
4.6 <i>Méréshez használt chippek típusai.....</i>	23
4.7 <i>Mérések menete.....</i>	24
4.7.1 Deszorpció.....	24
4.7.2 Kondicionálás és stabilizáció .....	24
4.7.3 Immobilizáció .....	25
4.7.4 Kinetika .....	26
4.7.5 Kísérleti eredményül kapott kinetikai paraméterek .....	27
4.7.6 Blankek szerepe.....	28
4.7.7 DMSO kalibráció szerepe .....	28
<b>5. Eredmények és értékelésük.....</b>	<b>29</b>
5.1 <i>Fetuin glikoprotein hasúta PNGáz F glikozidáz enzimmel.....</i>	29

5.1.1	Immobilizáció .....	29
5.1.2	Kinetika .....	30
5.1.3	Eredmények és értékelésük .....	32
<b>5.2</b>	<b><i>FtsZ fehérje és NCR247 peptid kölcsönhatásának vizsgálata</i></b> .....	<b>37</b>
5.2.1	Immobilizáció .....	37
5.2.2	Kinetika .....	41
5.2.3	Eredmények és értékelésük .....	48
<b>6.</b>	<b>Összefoglalás</b> .....	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b>Köszönetnyilvánítás</b> .....	<b>55</b>
	<b>Irodalomjegyzék</b> .....	<b>56</b>
	<b>Internetes hivatkozások</b> .....	<b>60</b>

## Kivonat

A rácszatolt interferometria (angolul Grating-Coupled Interferometry (GCI)) egy modern, nagyérzékenységű jelölésmentes optikai bioszenzor technika, mely kiválóan alkalmas különböző biomolekulák, köztük kis móltömegű molekulák kölcsönhatásainak kinetikai analízisére. A műszer nagyfokú érzékenységét bizonyítja, hogy már 100 Da tömegű molekulák, de akár ionok kapcsolódásainak valós idejű követését is lehetővé teszi. További előnye, hogy négycsatornás rendszerének köszönhetően referencia- és párhuzamos mérés is lebonyolítható egyidejűleg. A szenzor felületen immobilizált molekulák és a folyadékfázisba bevitt ligandumok közötti kölcsönhatás valós időben nyomon követhető a műszer segítségével.

Munkám során a fenti technika segítségével fehérjék és kismolekulák kapcsolódásait tanulmányoztam. Mérési elrendezéseimben a vizsgált fehérjéket kovalensen rögzítettem a GCI szenzor polimer bevonatának felületére, optimalizáltam a kikötési protokollt, kimértem a fehérje-ligandum kölcsönhatásra jellemző kinetikai paramétereket (asszociációs és disszociációs kinetikai ráták, egyensúlyi disszociációs állandó) és a nyert mennyiségeket kísérletesen is összehasonlítottam jól ismert modell rendszerek értékeivel. Továbbá, demonstráltam a GCI módszer alkalmazhatóságát glikofehérjéket hasító enzimek vizsgálatára is. Az egyes cukorrészek enzimátikus hasítását sikerült valós időben kimutatnom. Eredményeim tovább erősítik a GCI módszer alkalmazhatóságát gyógyszerható-anyagok kifejlesztéseiben, biológiai alap kutatásokban és egy új lehetőséget vezetnek be a glikofehérjék vizsgálatára.

## Abstract

Grating-Coupled Interferometry (GCI) is a high-sensitivity, label-free optical biosensor technique that is well suited for the kinetic analysis of the interactions of various molecules, including small molecules. The high sensitivity of the instrument is proven by the fact that it enables the real-time monitoring of the binding of molecules and ions weighing as little as 100 Da. Another advantage is that, thanks to its four-channel system, reference and parallel measurements can be carried out simultaneously. The interaction between molecules immobilized on the surface and ligands can be monitored in real time using the instrument.

During my work, I studied the affinity interactions of proteins and small molecules using the above technique. In my measurement setups, I covalently attached the investigated proteins to the polymer surface of the GCI sensor, optimized the binding protocol, measured the kinetic parameters characteristic of the protein-ligand interaction (association and dissociation kinetic rates, equilibrium dissociation constant) and experimentally compared them with the values of well-known model systems. Furthermore, I demonstrated the applicability of the GCI method to the examination of enzymes that cleave glycoproteins. I was able to detect the enzymatic cleavage of the individual sugar parts in real time. My results further strengthen the applicability of the GCI method in drug development and basic biological research, and introduce a new opportunity for the study of glycoproteins.

## Rövidítések

Asn	asparagine	aszparagin
CA	carbonic anhydrase	karbon-anhidráz
CAII	carbonic anhydrase II	karbon-anhidráz-II
DMSO	dimethyl sulfoxide	dimetil-szulfoxid
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimide hydrochloride	1-etil-3(3-dimetilaminopropil)- karbodiimid hidroklorid
Fts	filamentous temperature sensitive	fonalas hőérzékeny
FtsZ	filamentous temperature sensitive mutant Z	fonalas hőérzékeny mutáns Z
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	dipotassium hydrogen phosphate	dikálium-hidrogén-foszfát
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	potassium dihydrogen phosphate	kálium-dihidrogén-foszfát
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sodium dihydrogen phosphate	nátrium-dihidrogén-foszfát
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	sodium dihydrogen phosphate dihydrate	nátrium-dihidrogén-foszfát- dihidrát
NHS	N-hydroxysuccinimide	N-hidroxiszukcinimid
PBS	phosphate-buffered saline	foszfáttal puffereelt sóoldat
SDS	sodium dodecyl sulfate	nátrium-dodecil-szulfát
4-PCP	4-polycarboxylate polymer	4-poli-karboxilát polimer
4-PCH	4-thick polycarboxylate hydrogel	4-vastag polikarboxilát- hidrogél
Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	tantalum pentoxide	tantál-pentoxid

# 1. Bevezetés

A bioszenzorok tervezése és technológiai fejlesztése az elmúlt évtizedben exponenciális növekedésen ment keresztül és számos kutatás központi eleme lett. Mindez nem meglepő, és a bioszenzorok széleskörű alkalmazásainak köszönhető, mind az orvostudomány, mind a környezetvédelem, mind a biotechnológia területén. [1] [2]

A kutatómunkát az EK MFA Nanobioszenzorika Laboratóriumában végeztem, melynek során különböző koncentrációkban alkalmazott PNGáz F szénhidráthasító enzim deglikoziláló hatását vizsgáltam a fetuin glikoproteinen, illetve különböző növényi NCR peptidek bakteriális tubulin homológ FtsZ fehérjéhez való kötődésének mértékét is megfigyeltem jelölésmentes optikai bioszenzor felhasználásával.

A GCI egy nagyérzékenységű, hullámvezető interferometrián alapuló technika, mely széleskörű kinetikai vizsgálatok elvégzésére ad lehetőséget. Működésének alapját egy kitágított lézernyaláb képezi, melynek sugara kettéválik mérő- és referenciasugárra. A hullámvezető felület egy nagy törésmutatójú  $Ta_2O_5$  -réteg, a mérési felület pedig a hullámvezető azon szakaszát jelöli, ahol a mérőnyaláb végighalad. A felületen megkötődő molekulák törésmutató-változást eredményeznek az evaneszcens térben, ahol az elektromágneses hullám a szenzorfelülettől távolodva exponenciálisan csökkenő intenzitással van jelen. [3] [4] [5] A GCI technika kifejlesztésében a Nanobioszenzorika Laboratórium központi szerepet játszott.

A WAVEdelta (Creoptix AG, Svájc) elnevezésű műszer részét több egység képezi: a WAVEcore, ami a mérőberendezés, a WAVEsampler, ami a mintaadagoló rész, illetve egy vezérlő számítógép, ami WAVEcontrol program segítségével teszi lehetővé a valós idejű kísérlet-megfigyelést. A WAVEchip segítségével párhuzamosan több mérés bonyolítható le, emellett viszonyítási alapként funkcionáló referencia-csatorna alkalmazását is lehetővé teszi. [3] [4]

A kutatómunkám fő céljai közé tartozott, hogy bebizonyítsam a PNGáz F enzim deglikozilációs képességét a fetuin szénhidrát egységeivel kapcsolatosan, illetve, hogy az NCR peptidek és a chipfelületen immobilizált FtsZ fehérje között kialakuló molekuláris kinetikai kölcsönhatásokat megvizsgáljam jelölésmentes optikai bioszenzorral.

## 2. Szakirodalmi áttekintés

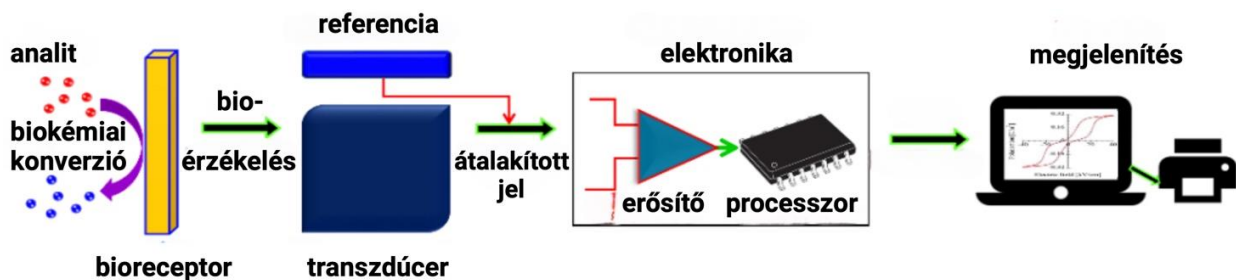
### 2.1 Optikai bioszenzorok

A bioszenzorok olyan érzékelők, melyek komplex mintában jelenlévő biomolekulák detektálására képesek. Mindezt úgy teszik, hogy az érzékelt fizikai vagy kémiai jelet optikai vagy elektromos jellé alakítják, ami végső soron az analit koncentrációjának meghatározásához használható fel. [2] [6]

A bioérzékelők többféle komponensből tevődnek össze. Van egy analit, amely definíció szerint azt az anyagot jelöli, mely összetevőinek azonosítása vagy kimutatása történik (például glükóz, ammónia vagy alkohol). A bioreceptor (ligandum) képes felismerni és kölcsönhatást kialakítani a célszubsztráttal (analittal). Funkciójuk szerint bioreceptor szerepet betölthetnek például enzimek, sejtek, nukleinsavak vagy antitestek. A jelátalakító, vagy másnéven transzdúcer a bioszenzorok kulcsfontosságú eleme, amely az analit-bioreceptor kölcsönhatások számával arányos optikai vagy elektromos jelet generál. A feldolgozás során az elektromos jelek erősítése és digitális formába történő alakítása zajlik, végső soron pedig a feldolgozott jeleket egy kijelző egység, általában számítógép számszerűsíti (2.1. ábra). [2] [6]

A jelátvitel módszere szerint beszélhetünk optikai, elektrokémiai, kalorimetrikus, piezoelektromos vagy mágneses bioszenzorokról. Az optikai bioszenzorok működése az optikai mező és a bioérzékelő elem kölcsönhatásának kihasználásán alapul, és jelöléses, valamint jelölésmentes detektálásra osztható. Utóbbi esetében a detektált jelet közvetlenül az elemzett anyag és a jelátalakító kölcsönhatása hozza létre. [1]

Az optikai bioszenzorok számos előnnyel bírnak a hagyományos analitikai technikákkal szemben, mivel lehetővé teszik a minták valós idejű és jelölésmentes detektálását. Nagyfokú specificitással és érzékenységgel rendelkeznek, emellett viszonylag kis méretűek és költséghatékonyak. [1]



2.1. ábra: Sematikus ábra a bioszenzorok működéséről Naresh, V., & Lee, N. cikke alapján. [2]



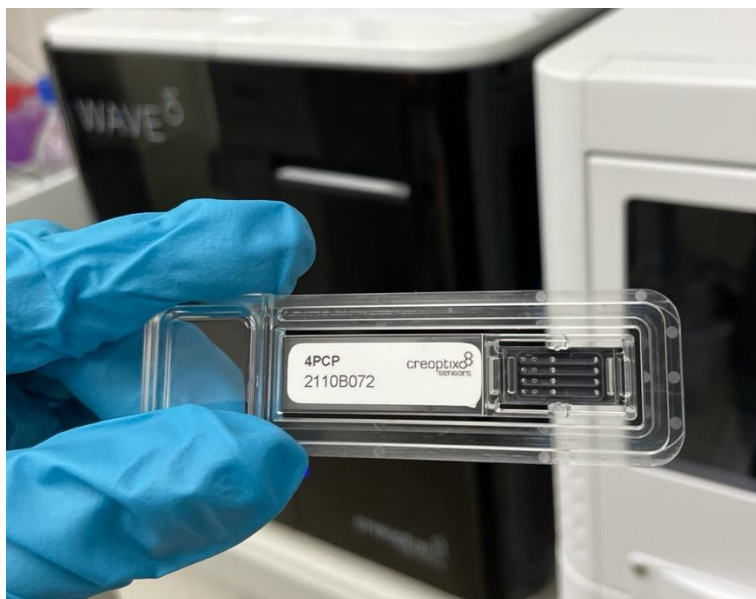
### 2.1.1 A GCI bioszenzor felépítése

A GCI (grating-coupled interferometry) olyan hullámvezető interferometrián alapuló módszer, mely molekuláris kölcsönhatások megfigyelése mellett immobilizált ligandummal kölcsönhatásba lépő molekulák koncentrációjának, egyes kinetikai paramétereinek, és a kötőhelyek affinitási állandóinak meghatározására is lehetőséget ad. A műszer egy rendkívül nagy érzékenységgel rendelkező - már 100 Da alatti tömegű molekulák (vagy akár ionok) mérésére is lehetőséget biztosító - jelölésmentes optikai bioszenzor. [3] [4]

A WAVEdelta elnevezésű készülék több részből tevődik össze: a WAVEcore mérőegységből és a WAVEsampler mintafelvevő egységből – melyek a 2.2. ábrán figyelhetők meg –, illetve egy vezérlésre használt számítógép is a műszer részét képezi. Az úgynevezett WAVEchip – a 2.3. ábrán-, amely négy mikrofluidikai csatornával rendelkezik, mindig a mérőegység elején kerül behelyezésre. A négy mikrofluidikai csatornának köszönhetően egyszerre több mérés is lebonyolítható, illetve referenciacsatorna alkalmazása is lehetséges, mely viszonyítási alapként szolgálhat a kísérletek során. [3] [4]



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

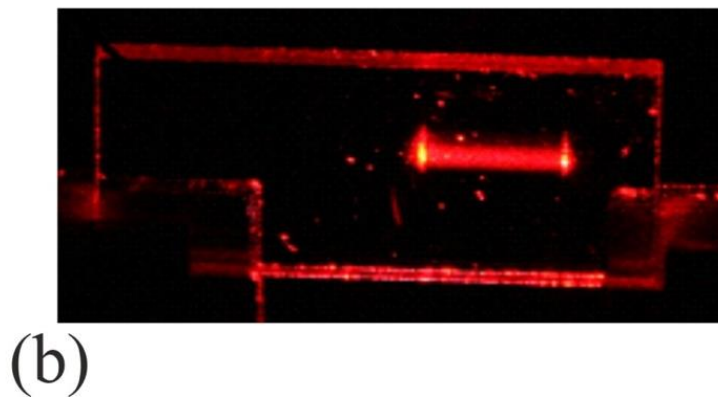
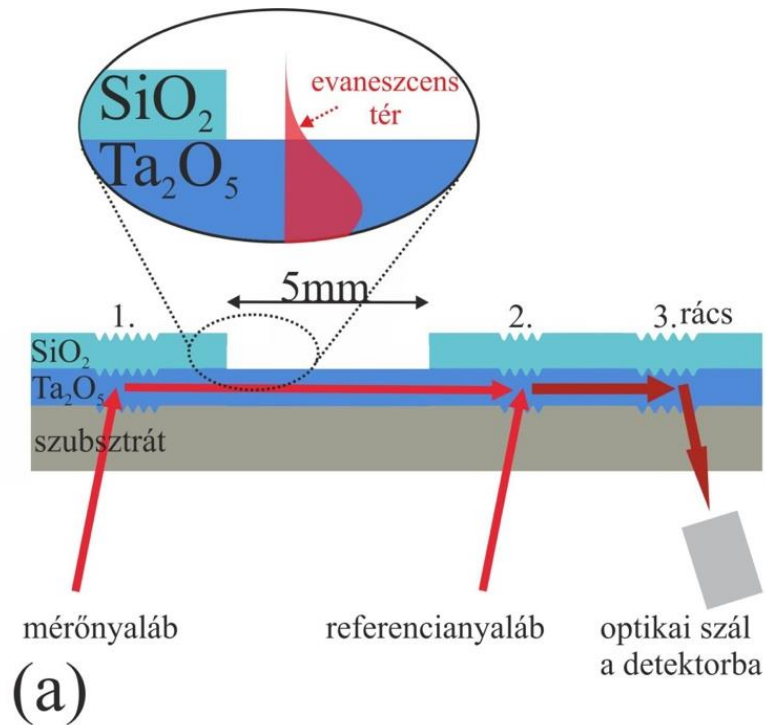


**2.3. ábra:** 4-poli-karboxilát polimer felülettel borított Creoptix WAVEchip (hullámvezető szenzor integrált mikrofluidikával). A képen jól látható a 4 db párhuzamos mérőcella.

### 2.1.2 A GCI bioszenzor működési elve

A szenzor működésének alapja egy eredetileg 0,8 mm széles, kitágított lézernyaláb, amely kétcélszerű folyadékkristály-modulátoron (Liquid Crystal Modulator, LCM) keresztül világítja meg a GCI chipet. A lézerforrás fénysugara ketté van osztva mérősugárra, illetve referenciasugárra, és ezek egy optikai hullámvezető  $Ta_2O_5$ -rétegbe vannak bevezetve. A hullámvezető felület – egy, a két becsatolási rács közötti 2-3 mm hosszú terület kivételével - vastag  $SiO_2$ -réteggel van borítva (2.4. ábra). A két sugár tökéletesen párhuzamos, és ugyanazon a folyadékkristály modulátoron haladnak keresztül. A mérési felület a GCI esetében a hullámvezető azon szakaszát jelenti, ahol a mérősugár halad, és törésmutató-változás következik be az úgynevezett evaneszcens térben. Az evaneszcens tér a hullámvezető réteg felülete fölötti azon térrész, ahol az elektromágneses hullám adott, a felülettől távolodva exponenciálisan csökkenő intenzitással jelen van. A kialakult evaneszcens tér a már említett, két rács között elhelyezkedő, 2-3 mm hosszú területen lép kölcsönhatásba az általunk kiválasztott mintával. Amikor a mérősugár találkozik a referenciasugárral, a kettő interferál egymással, és együttesen hozzák létre az interferencia jelet. Az eredő jel kicsatolódik egy 3. rácson keresztül a detektorba, ahol az eredő intenzitás és az interferencia mérésére nyílik lehetőség. A mérőnyaláb fázisának változásával az interferencia karakterisztikája is

megváltozik. Az interferencia-karakterisztika nagypontosságú méréséhez időben változó jelet szükséges előállítani, erre szolgál a már említett LCM. [4] [5]



**2.4. ábra:** A GCI bioszenzor működése Patko, D és társai cikke alapján. **A:** a mérő-és a referenciányaláb becsatolódik, és egy harmadik rácson keresztül csatolódnak ki. **B:** a hullámvezetőben terjedő fény.[5]

### 2.1.3 Hagyományos és RAPID kinetika összehasonlítása

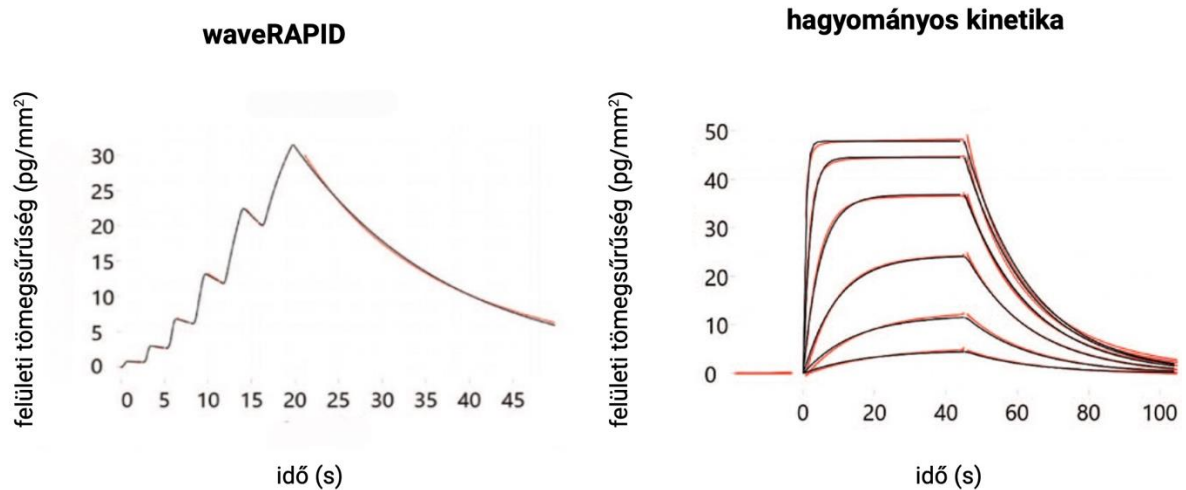
A hagyományos, több koncentrációval végzett kinetikai mérés segítségével a vizsgálandó minta részletes kinetikai elemzése valósítható meg, a kiértékelés során széleskörű kinetikai adatmennyiség nyerhető ki. A módszer hátránya viszont, hogy időigényes és a mérés anyagigénye is jóval nagyobb, hiszen egy hígítási sornak megfelelően különböző koncentrációjú mintaoldatokat szükséges készíteni. Ezenfelül az analit-ligand közötti kölcsönhatást illetően előzetes információk is szükségesek a mérés lebonyolításához.

Számos alap kutatásban és a gyógyszerkutatási folyamatokban elengedhetetlen, hogy a potenciális (gyógyszer)hatóanyagokat szűrni tudjuk az adott, a kutatáshoz releváns szempontok szerint. A hagyományos kinetika éppen ezért nem a legmegfelelőbb erre, a már említett időigénye miatt. Illetve ezekben az esetekben sokszor nem rendelkeznek előzetes információról az adott molekulák affinitásával kapcsolatban. Ennek kiküszöbölésére alkalmazható az úgynevezett RAPID (Repeated Analyte Pulses of Increasing Duration) kinetikai mérési módszer. Ennek során a disszociációs, azaz a lemosási lépés mindenhol rögzítésre kerül, de az asszociációs lépés során különböző injektálási időket alkalmazva áramoltatjuk a mintát. Utóbbi megadott időintervallumot foglal magába, ami ciklusról ciklusra egyre hosszabb időt jelent. A minta hat egymást követő, rövid, növekvő időtartamú ciklusban kerül injektálásra az immobilizált ligandum felett. A módszer rendkívüli előnye, hogy segítségével rövid idő alatt a mintánk- akár több ezer minta szűrése is - teljeskörű kinetikai jellemzése valósítható meg. [7] [8] [9]

A WAVEcontrol szoftver egy olyan lehetőséget is kínál a kinetikai kölcsönhatás-vizsgálathoz, amellyel háromféle affinitási tartomány közül lehet választani a ligandum és az analit közötti kölcsönhatás alapján.

1. *Weak binders* ( $K_D$ -érték  $1 \mu\text{M} - 100 \mu\text{M}$  között) gyenge kölcsönhatás esetén.
2. *Intermediate binders* ( $K_D$ -érték  $5 \text{ nM} - 5 \mu\text{M}$  között) közepes erősségű kölcsönhatás esetén.
3. *Tight binders* (pM-os tartományba eső  $K_D$ -érték  $20 \text{ nM}$ -ig) erős kölcsönhatás esetén.

Ez az előbeállítás minden esetben az adott tartományhoz optimalizálja a különböző injektálási paramétereket, mint az alkalmazandó analit-koncentrációk, az asszociációs- és disszociációs idő, és az áramlási sebesség.[8] [9]



2.5. ábra: A RAPID és a hagyományos kinetika összehasonlítása. [9]

## 2.2 Glikoproteinek

A molekuláris biológia centrális dogmája kimondja, hogy az élő szervezetekben az információ áramlása egyirányú, azaz DNS-ről RNS, majd fehérje képződik. A transzlációt, az intracelluláris fehérjeszintézist követően azonban további változások mennek még végbe, amelyek szükségesek ahhoz, hogy egy sejt, szövet és szervezet a későbbiekben majd el tudja látni biológiai funkcióját, aktivitását. Mindez a poszttranszlációs módosítások révén valósul meg, melyek a fehérjékben a szintézis után végbemenő, jellemzően enzimek által katalizált, kovalens kémiai módosításokat jelentik. [i1] [10]

A fehérje-glikoziláció az egyik leggyakrabban előforduló poszttranszlációs módosítás, mely egy szénhidrát-rész kovalens kapcsolódását jelenti egy aminosavhoz, ezáltal glikoproteint alkotva. A glikozilációs reakciók igen sokfélék, és különböző enzimek segítségével valósulnak meg, amelyek specifikus glikánokat, szénhidrát-komponenseket kötnek specifikus aminosavakhoz. [i1]

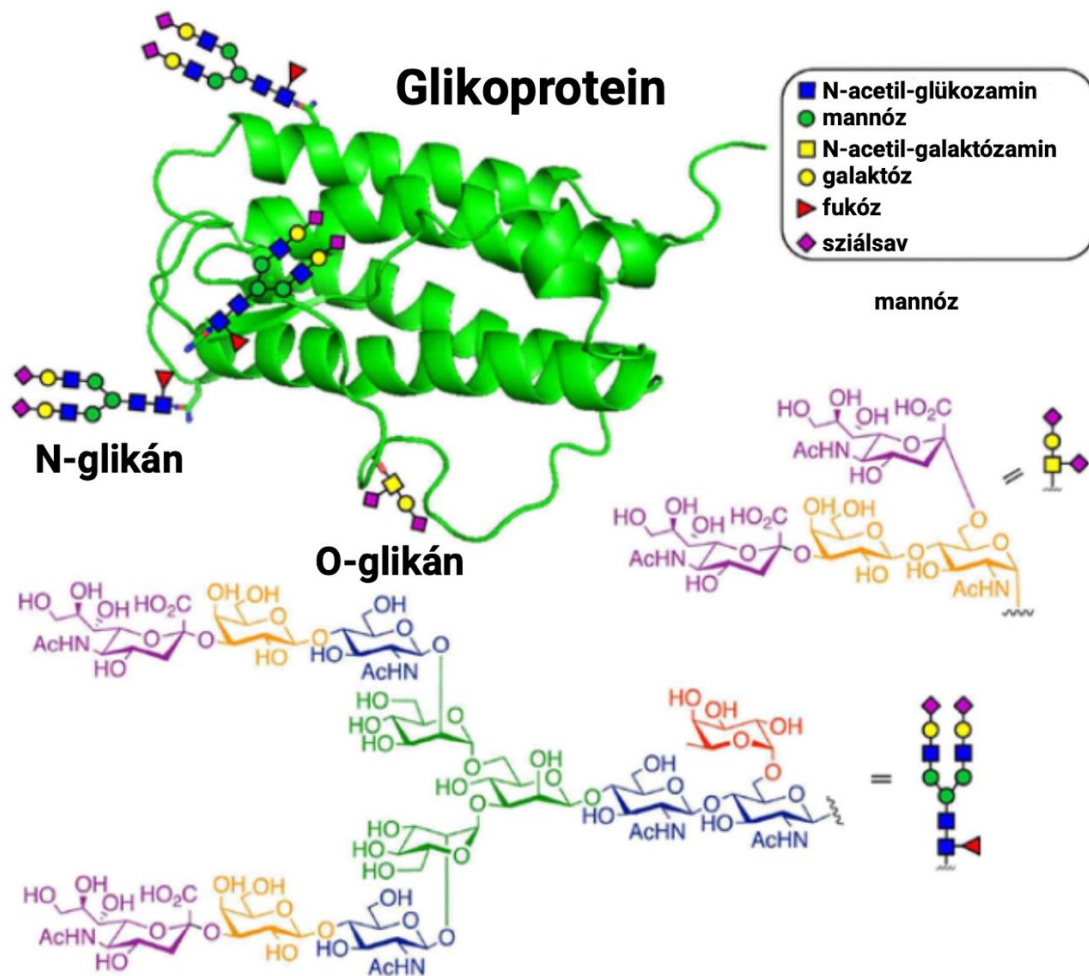
Az eukarióta fehérjék glikozilációját általában két fő típusba sorolják. Ezek közül egyik az N-kötésű, amikor a cukormolekula az aszparagin aminosav nitrogénjéhez kapcsolódik, míg másik az O-kötésű, amikor a cukormolekula a szerin vagy treonin aminosav oxigénatomjához

kötődik (2.6. ábra). A protein-glikoziláció a sejtek kulcsfontosságú fiziológiai és patológiás folyamatait szabályozza a szervezetben. Az aberráns, normálistól eltérő glikoziláció éppen ezért szorosan összefügg bizonyos betegségek kialakulásával. Mindez megmagyarázza, miért is releváns a glikoziláció jelenségével kapcsolatos kísérletek végzése. [i1] [11]

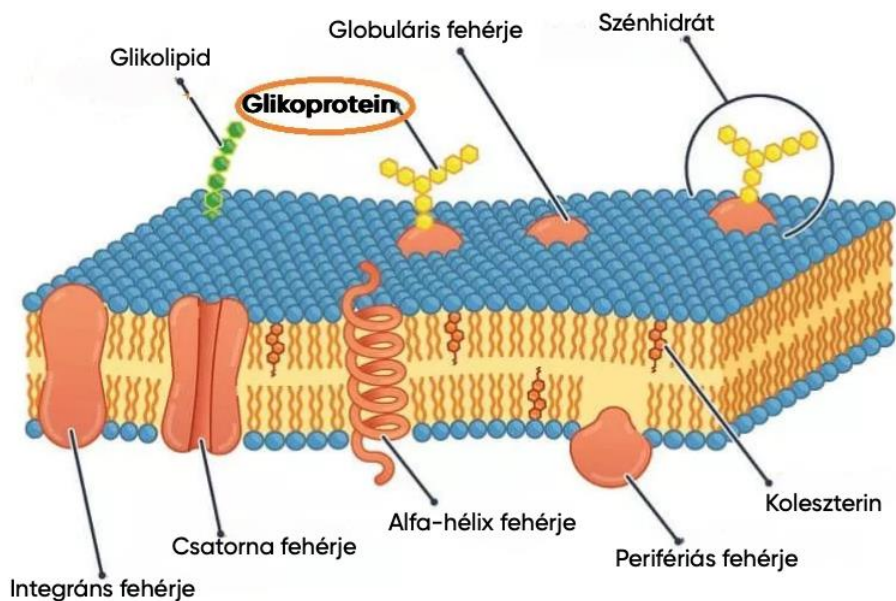
A glikoproteinek olyan fehérjék, amelyek N- és O-glikozidos kötéssel rendelkező, összetett szerkezetű és funkciójú szénhidrátláncokat hordoznak. Szerkezetükre már nevükből is következtethetünk: fehérjéhez kötött cukorrészt foglalnak magukba. E két komponens kovalens kémiai kötéssel kapcsolódik egymáshoz, mely egy rendkívül stabil molekulát képez, és nem csak megakadályozza a peptidkötések proteolízis során történő lebomlását, hanem hőmérséklettel szemben is sokkalta ellenállóbbá teszi. [i2] [12]

Oldott, membránhoz kötött (2.7. ábra) és extracelluláris folyadék formájában szintúgy jelen vannak a sejtekben, azok felületén elhelyezkedve részben a sejtek egymáshoz tapadását szolgálják, részben pedig a sejt és környezete között meghatározott molekulák, ionok vándorlását, szállítását teszik lehetővé. Az élő szervezetben számos biokémiai folyamat szerves részét képezik. Funkciójuk szerint legtöbbször enzimek, transzfermolekulák, jelzőfehérjék vagy strukturális komponensek, de közreműködnek a hormonképzésben, a véralvadásban és az immunrendszer működésében is. [i2] [13]





2.6. ábra: A glikoproteinek felépítése az N-glikán és O-glikán szénhidrátkomponensekkel Li, Y és társai cikke alapján. [14]



2.7. ábra: Glikoproteinek és más membránalkotók a sejtmembránba ágyazva Sarah Knapp cikke alapján. [i2]

### 2.2.1 *Fetuin glikoprotein*

A fetuin vagy másnéven alfa-2-Heremans Schmid glikoprotein (AHSG) olyan heterodimer plazma-glikoprotein, amely egy 282 aminosavból álló A-láncot és egy 27 aminosav-maradványból álló, inter-diszulfidkötéssel összekapcsolt B-láncot tartalmaz. Elsősorban embrionális sejtekben, illetve hepatocitákban expresszálódik, és a vérben, valamint az extracelluláris folyadékban található meg. 1944-ben Kai Pedersen fedezte fel magzati borjúsérumban. [15] [16] [17]

Bár a fetuin-A poszttranszlációs módosításai nem teljesen tisztázottak és igen változók lehetnek, számos vizsgálat azt támasztja alá, hogy a humán fetuin A és B polipeptidláncai egyaránt glikoziláción, proteolitikus hasításon, feltekeredésen és foszforiláción is keresztülmennek a biológiailag aktív glikoprotein szerkezet kialakulásáig. A natív fetuin-A módosítása általában N-glikozilációval indul a durva felszínű endoplazmatikus retikulumban, amelyet O-glikoziláció követ a Golgi-apparátusban. [15]

Számos kutatási eredmény arra enged következtetni, hogy a fetuin-A rendkívül multifunkcionális szerepkört betöltő fehérje. Olyan alapvető biológiai folyamatokban játszik kulcsfontosságú szerepet, mint például a csont- és kalcium-anyagcsere, vagy az inzulin-jelátvitel. A fetuin-A-ról azt is megállapították, hogy közreműködik különböző kórképek kialakulásában, mint például az inzulinrezisztencia (IR), a 2-es típusú diabetes mellitus (T2DM), a nem alkoholos zsírmájbetegség (NAFLD), egyes szív- és érrendszeri betegségek (CVD), bizonyos daganatos elváltozások és agyi rendellenességek. [15]

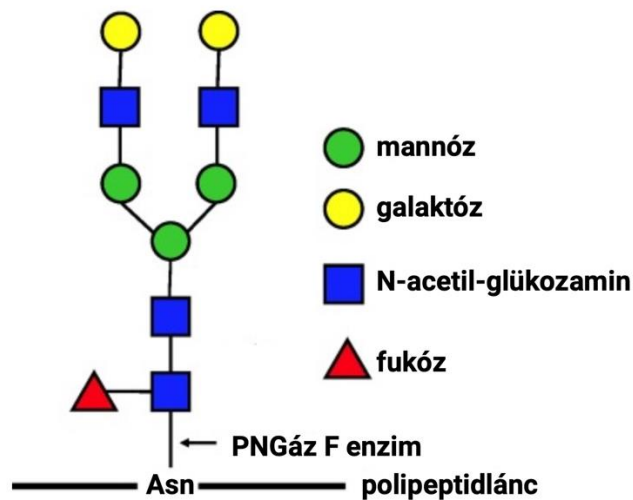
### 2.2.2 *PNGáz F enzim*

A PNGáz F (másnéven glikopeptidáz F vagy peptid-N4-(N-acetil-béta-glükózaminil) aszparagin amidáz) az egyik leghatékonyabb, illetve legszélesebb körben használt glikozidáz enzim a N-kötésű oligoszacharidok lehasítására, eltávolítására a glikoproteinekről és glikopeptidekről, melyek így proteomikai elemzés alá vethetők (2.8. ábra). A glikopeptidáz enzim a komplex oligoszacharidok N-acetil-glükózamin- és aszparagin-maradékai között hasít. [i3] [i4]

A PNGáz F-et gyakran használják annak meghatározására, hogy a fehérjék tartalmazzak-e glikozilált peptideket, és hogy a deglikoziláció befolyásolja-e a fehérje enzimaktivitását. Emellett előszeretettel alkalmazzák fehérjék és/vagy peptidek glikozilációs



szintjének meghatározására, N-glikánok funkcionális szerepének elemzésére és fehérjék heterogenitásának csökkentésére. [i4]



**2.8. ábra:** PNGáz F enzim hasítása a glikoprotein N-acetilglükózamin és aszparagin része között Karav S., és társai cikke alapján. [18]

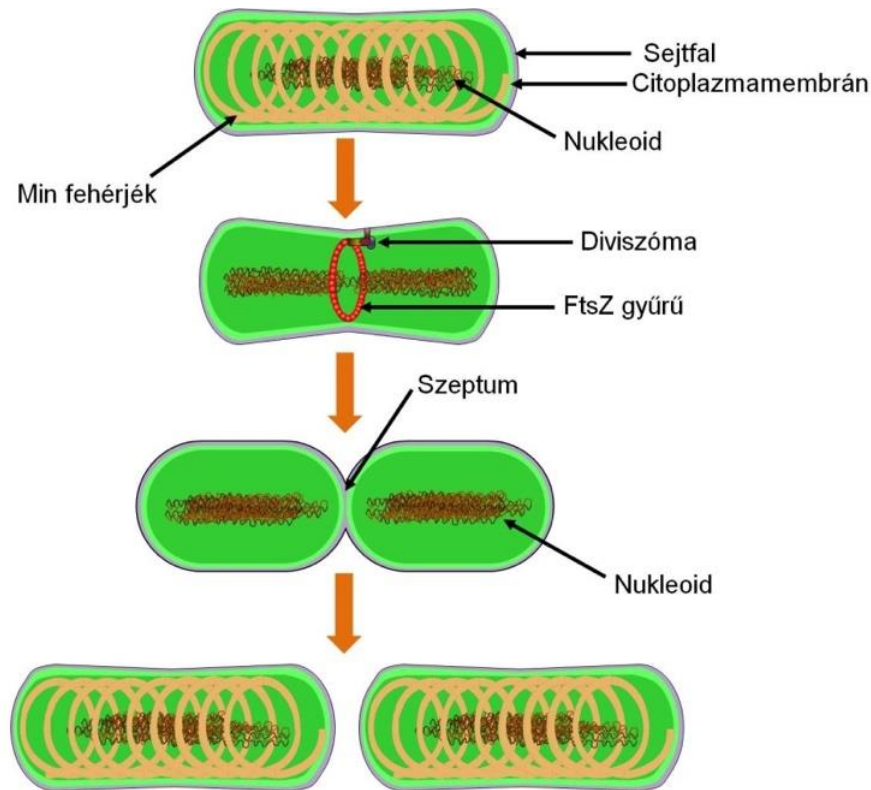
### 2.3 FtsZ fehérje

A prokarióta sejtosztódás igen szigorúan kontrollált folyamat, melynek során jellemzően megnyúlással, majd azt követően az úgynevezett szeptum mentén történő kettéválással alakulnak ki az azonos méretű lánysejtek. A szigorú kontroll elengedhetetlen része a normál sejtosztódás fenntartásának, hiszen az abberáns hasadás megváltozott sejtformológiához vezethet, vagy akár sejtpusztulást is vonhat maga után. [19] [20]

Az osztódási folyamatban (2.9. ábra) központi szerepet tölt be a diviszóma nevezetű nagyméretű fehérjekomplex, amely a baktériumsejtek osztódását számos más fehérje segítségével irányítja és szabályozza. Magát a diviszómát az Fts (filamentous temperature sensitive, magyarul fonalas hőérzékeny) fehérjék alakítják ki, köztük is kiemelkedő szerepkörrel bírnak az FtsZ fehérjék, melyek valamennyi baktériumban megtalálhatóak. Jellegzetes, úgynevezett Z-gyűrűbe képesek polimerizálódni, ezáltal létrehozva a sejtosztódás, illetve a szeptumképződés helyét. [19] [21]

A Z-gyűrűhöz más fehérjék is kapcsolódnak, melyek különböző funkciókkal bírnak: a ZipA a gyűrűt a sejtmembránba köti, az FtsI a proteoglikán-szintézisért felel, az FtsK a kromoszómák szegregációjában játszik szerepet, és az FtsA is kapcsolatot teremt a gyűrűvel, mely egy, a folyamat energiaszükségletét ATP hidrolízisével biztosító, úgynevezett ATPáz.

A kromoszómaszegregáció befejeztével a sejt a szeptum mentén kezd el összehúzódni, és a Z-gyűrű folyamatos depolimerizációja következik be, GTP energiájának segítségével. Mindeközben a sejtfa szintézise is zajlik a szeptumnak megfelelően, végül pedig az osztódási ciklust a két lánysejt elválása zárja le. [19][21]



2.9. ábra: Sematikus ábra a bakteriális sejtosztódás folyamatáról. [19]

## 2.4 NCR peptidek

A szimbiózis populáció-kölcsönhatás egyik alapvető típusa a növények mikroorganizmusokkal alkotott, mindkét fél számára előnyös (mutualista) együttélése. A szimbiotikus típusú kölcsönhatások általános jellemzője, hogy valamely típusú tápanyaghiány fennállása esetén alkalmazkodási képességet biztosítson az adott gazdaszervezet számára. [22]

A mikroorganizmusok és a gazdaszervezetek között kialakuló szimbiózisban gyakori jelenség az úgynevezett szimbiotikus szervek kialakulása, mely a talajlakó *Rhizobium* baktériumfajok pillangósvirágúak családjával (*Fabaceae*) alkotott, gazdaspecifikus szimbiózisában is megfigyelhető. A folyamat során nitrogén megkötésére alkalmas

gyökérgümők jönnek létre, és ezek úgynevezett szimbioszóma-vezikulák formájában adnak otthont a nitrogén fixálásra képes baktériumoknak. [23]

A gazdaszervezet flavonoid-típusú vegyületeket bocsát ki, amelyek a NodD transzkripciós regulátorral a szimbiotikus partnerben a nodulációs gének aktiválásáért felelnek. Azok így működésbe lépnek, és a gümőfejlődésben, valamint magában a szimbiózis kialakításában fontos szerepkört betöltő Nod-faktorokat állítanak elő. [23] [24]

A két, szimbiózisban résztvevő partnert az úgynevezett peribakteroid membrán választja el, ezen keresztül zajlik a különféle metabolitok cseréje a partnerek között. A gazdaszervezet malátot biztosít a nitrogéngáz redukálásához, homocitrátot a nitrogénáz enzimkomplex működéséhez, valamint a számára esszenciális tápanyagokkal is ellátja a bakteroidot, ami pedig ammóniumion formájában fedezi a növény nitrogén-szükségletét. Az ammóniumion azonnal glutaminná alakul a növényi sejt citoplazmájában. Ezáltal valósul meg a mutualista együttélés. [23] [25] [26]

A nitrogén megkötését végző baktériumok mérete, formája, genetikai állománya különböző lehet az egyes gazdaszervezetekben. Vannak növények, amelyekben a baktérium partnerek mérete, formája, genetikai állománya teljes mértékben azonos ugyanazon faj szabadon élő egyedeivel. Ezzel ellentétben bizonyos növényekben, például *Medicago*-fajokban vagy a borsóban a baktériumok nyúlási folyamaton mennek keresztül, mely kiegészül a sejtmembránjuk permeabilitásának jelentős megnövekedésével. Mindezek mellett sejtosztódási képességüket is visszafordíthatatlanul elveszítik, úgynevezett terminális differenciálódáson mennek keresztül, melyben az NCR-peptidcsalád játszik nélkülözhetetlen szerepet. Kísérletek arra mutattak rá, hogy ezen peptidek olyannyira esszenciálisak a bakteroid differenciálódásban, hogy hiányuk fennállása esetén a differenciálódás teljesen megszűnt. [23] [27]

Az NCR-ek olyan peptidek, melyek 30-50 aminosavból állnak és jellegzetes mintázattal bírnak, melyet 4-6 cisztein oldallánc alkot. Aminosav-összetételükben azonban jelentősen eltérhetnek egymástól: megkülönböztethetünk kationos, anionos, illetve semleges töltésű peptideket is. Az általam vizsgált NCR247 peptidmolekula képes kölcsönhatni a bakteriális FtsZ fehérjével, így meggátolva azt a polimerizációban, és a szeptumképződés helyének kialakításában. [23] [24]

Kutatások bizonyos kationos *M. truncatula* NCR-ek antibakteriális és fungicid hatását támasztották alá. Mindemellett számos előnnyel is bírnak, mint a széles spektrumú és gyors hatásmód, a humán sejtekre nem, vagy csak rendkívül kis mértékben gyakorolnak citotoxikus hatást, illetve az ellenük esetlegesen kialakuló rezisztencia esélye is minimális. [23] [24]

### 3. Célkitűzés

A kutatómunka során célul tűztem ki különféle fehérje-ligandok kismolekulás hatóanyagokkal való molekuláris kinetikai kölcsönhatásainak megfigyelését GCI jelölésmentes optikai bioszenzoron, többféle mérési felállással. Célom volt a WAVEcontrol program használatának rutinszerű elsajátítása és a fenti jelenségek valós idejű nyomon követése.

Kísérleteimben törekedem, hogy az immobilizációs szériában minél nagyobb felületi tömegsűrűségű fetuin, illetve FtsZ fehérjét kösse ki a chip mérőcsatornáinak felületére.

Emellett a kinetikai szériában a különböző PNGáz F-enzim injektálásával, szénhidrát-komponenseket szeretnék leemészteni a glikoproteinről. Az NCR247 peptid analit áramoltatásával pedig további célom a kialakuló analit-ligand kölcsönhatásról minél részletesebb kinetikai adatokat kinyerése.

Végül a kísérleti adatok kiértékelése során szeretném meghatározni a kölcsönhatást leíró legfontosabb kinetikai paramétereket, melyek konzekvenciájául és alapjául szolgálnak a kísérleteim folytatásának, az eredmények tudományos folyóiratokban történő közlésének.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1 Kísérlethez használt anyagok

	<b>Fetuin glikoprotein hasítása PNGáz F enzimmel</b>	<b>FtsZ fehérje és NCR247 peptid kölsönhatásának vizsgálata</b>
<i>Deszorpció</i>	SDS (Sigma-Aldrich)	
	glicin (Sigma-Aldrich)	
	Milli-Q víz (ultratiszta víz, 18,2 MΩ·cm ellenállású 25°C-on)	
<i>Kondicionálás</i>	borát puffer, pH=9 (Xantec Bioanalytics)	
	0,2-szeres hígítású PBS-oldat	
<i>Immobilizáció</i>	EDC/NHS (Xantec Bioanalytics)	
	etanolamin, pH=8 (Sigma-Aldrich)	
	fetuin (Pannon Egyetem)	FtsZ (Szegei Tudományegyetem)
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Spektrum 3D)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Spektrum 3D)
<i>Kinetika</i>	PNGáz F enzim (Pannon Egyetem)	NCR247-peptidoldat (Szegei Tudományegyetem)
	tömény PBS mérőpuffer	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mérőpuffer
		DMSO (VWR International)

**4.1. táblázat:** A kísérletekhez felhasznált anyagok.

### 4.2 Kötéskémiahoz használt reagensek készítése

A kötéskémiahoz használt reagenseket a Thermo Fisher leírása alapján készítettük el. [i6]

Az EDC/NHS reagens az aminkapcsolással megvalósuló immobilizáció legfontosabb reagens, amely lehetővé teszi a ligandum chipfelületre való kovalens kikötését. Fontos tudnivaló volt, hogy ezek a reagensek rendkívül reakcióképesek, így a velük való munka kiemelt gyorsaságot, precizitást, előkészületeket igényel.

Az oldatkészítés megkezdése előtt 30 perccel 50 ml MQ vizet helyeztünk a hűtőszekrénybe. A reagenseket -18 Celsius-fokon tároltuk, és a fagyasztóból való kivételt követően azonnal neki is kezdtünk az oldatok elkészítésének.

0,2 g EDC-t 15 ml hideg MQ-ban oldottunk fel, és a teljes oldódást követően a már előkészített, 0,5 ml térfogatú eppendorf-csövekbe mértem be az EDC-oldat 500 µl térfogatait. A pipettázás végeztével az eppendorfokat rögtön mélyhűtőbe tettük.

Ezután következett az NHS-oldat készítése. A vegyület 1 g-ját 13 ml hideg MQ-ban oldottam be, melyet szintén 500 µl térfogatonként mértem az eppendorfokba. A munka végeztével ezek is azonnal a fagyasztóba kerültek.

Az immobilizáció előkészületei során az EDC/NHS-reagensek fagyasztóból való kivétele mindig az utolsó lépés, mivel azok maximum 25 percig őrzik meg hatékonyságukat. Az oldatok azonos, 500-500 µl térfogatának elegyítésével pontosan az immobilizáció műveletéhez előírt, 0,2 M-os EDC és 0,05 M-os NHS elegyet kapunk.

### *4.3 Immobilizációhoz használt $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -oldat készítése*

Mivel az FtsZ fehérje izoelektromos pontja pH 4,9-re tehető [28], ennek okán ehhez az értékhez nagyon közeli pH-értékű  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -puffert készítettünk, hogy minél nagyobb mennyiségű fehérje kötődhessen ki a mérőcsatornákra a kovalens kötéskémiával, és minél eredményesebb lehessen a kísérletezés.

Az oldatot az 1 M-os oldat tízszeres, 100 mM-os koncentrációra való hígításával készítettem a MQ-val.

### *4.4 Kálium-foszfát-mérőpuffer készítése*

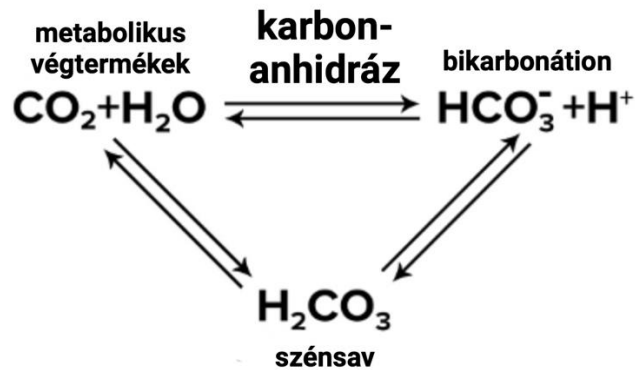
A kinetikai szériában alkalmazott kálium-foszfát-mérőpuffert egy A-, illetve egy B-oldat elegyítésével készítettem el.

Az A oldathoz 17,42 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -ot mértem be, melyet 100 ml MQ-ban oldottam fel. A B oldathoz 13,61 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -ot mértem be és 100 ml MQ-ban oldottam fel. Így kaptam 1-1 M-os oldatokat.

A pH=7-es pufferhez 61,5 ml A-oldatot és 38,5 ml B-oldatot elegyítettem, és annak okán, hogy 100 mM-os puffert szerettem volna készíteni, így 1000 ml-re egészítettem ki az oldatot MQ-val.

#### 4.5. Acetazolamid, mint kontroll molekula

A karbon-anhidráz a szén-dioxid reverzibilis hidratálását katalizáló, a szervezetünkben is megtalálható enzim, mely szubsztrátjából bikarbonátot és hidrogéniont állít elő, az alábbi reakció szerint. (4.1. ábra) [29]



4.1. ábra: A karbon-anhidráz által katalizált biokémiai reakció. [i5]

Emberben a CA 7-féle izoenzimét azonosították, de mind közül legjelentősebb a CA-II, mely a legelterjedtebb, és rendkívül fontos funkciót lát el az agyban, vesében, illetve csontokban zajló egyes fiziológias folyamatokban. [30] Munkám során én is ezzel az izováltozattal dolgoztam.

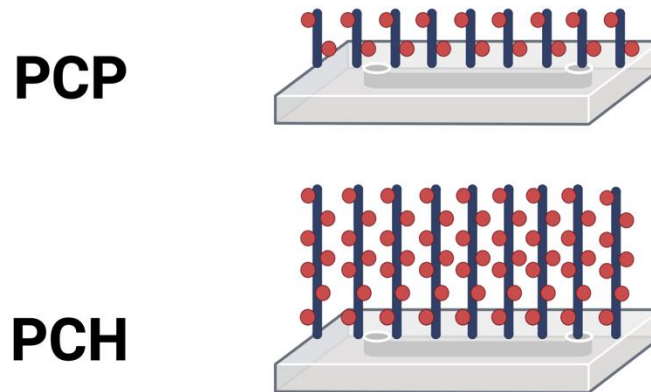
Mivel a karbon-anhidrázt számos szövet használja iontranszportjának szabályozására, ennek okán az enzim fontos terápiás célpont lett a terápiában. Inhibitorait különböző betegségek - mint a glaukóma és az epilepszia – kezelésére használják, de potenciális gyógyszer-célpont lehet akár a rák vagy az elhízás kezelése esetén is. Ennek okán kismolekulás hatóanyagvizsgálatok kiváló alanyául szolgálhat. [30] [31]

Az acetazolamid a karbon-anhidráz-gátló gyógyszerek közé tartozik. Mivel a karbon-anhidráz erős, nem kompetitív inhibitora, így a szervezetben minden olyan helyen hatást tud kifejteni, ahol az enzim jelen van, és így gátlása révén az nem képes bikarbonátot és hidrogéniont előállítani a szén-dioxidból és a vízből. [30] [32]

#### 4.6 Méréshez használt chipek típusai

A mérések négycsatornás, PCP-, illetve PCH-felületű WAVEchip segítségével valósulnak meg, melyek sematikus ábrája a 4.2. ábrán figyelhető meg. A PCH-chip egy jóval a vastagabb hidrogél bevonattal rendelkezik, mely nagyobb potenciális kötődési felületet biztosít az adott ligandumnak.

A chip felületére történik meg a ligandum immobilizálása, kovalens kikötése. A chip csatornáin a mérések során folyamatos az oldat-áramoltatás.



*4.2. ábra: PCP-, illetve PCH felületű Creoptix WAVEchip sematikus ábrája.*

## 4.7 Mérések menete

### 4.7.1 Deszorpció

A kísérlet megkezdése előtt, mielőtt még új WAVEchipet helyeznénk a műszerbe, szükséges művelet az úgynevezett deszorpció elvégzése, mely minden esetben az előzőleg használt chipen történik. Ennek keretében 0,5%-os SDS-, glicin-, illetve MQ-oldatokkal a megkötött ligandumok chipfelületről való eltávolítására és a fluidika kitisztítására kerül sor.

### 4.7.2 Kondicionálás és stabilizáció

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

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

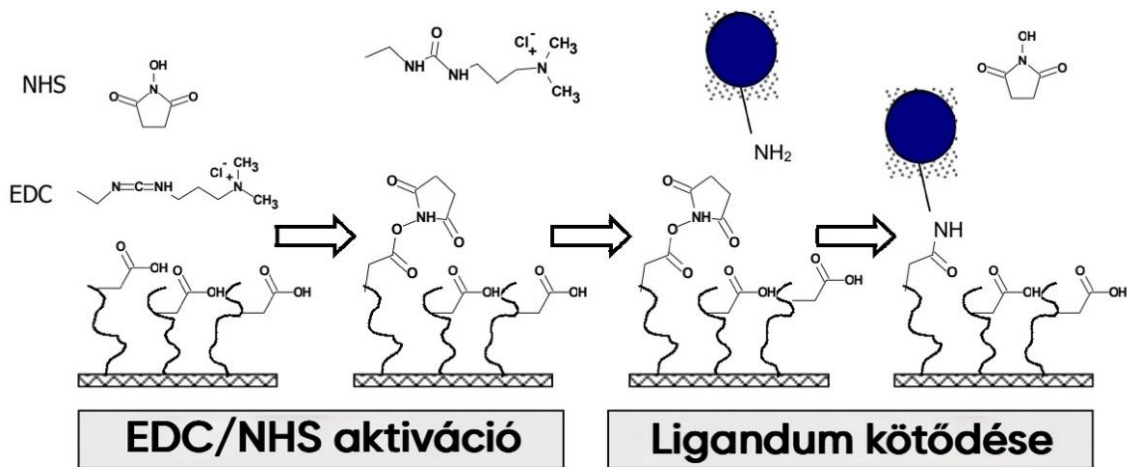


kondicionálási művelet során 50 mM-os koncentrációjú, pH 9-es borát puffer-oldat injektálása zajlik a chip csatornáin.

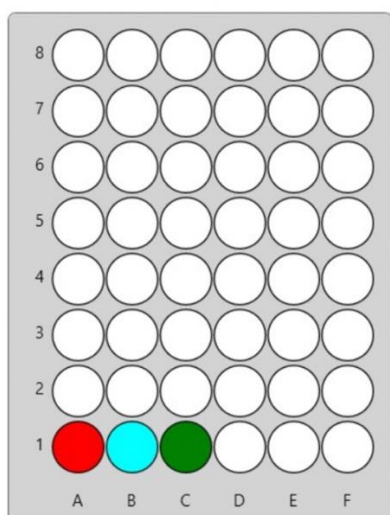
A kondicionálást stabilizációs művelet követi, mely a méréshez használt puffer áramoltatását jelenti az alapvonal beállításának céljából. A stabilizációs szériát úgynevezett 'startupok' alkotják.

### 4.7.3 Immobilizáció

Fehérje-ligandumok esetében a legáltalánosabban használt immobilizációs módszer az úgynevezett aminkapcsolás (4.3. ábra), mely egy kovalens kémiai kapcsolat. Ennek során az immobilizáció a szabad primer amino-csoportokon keresztül történik, mint például a lizin-maradványok, vagy a fehérjék és peptidek gyakori komponense, úgynevezett N-terminálisa. A PCP WAVEchip polikarboxilát-alapú, hidrogél bevonata szabad karboxil-csoportokat hordoz, amelyhez a fehérjét EDC/NHS kötéskémia segítségével, az előbb említett módon kovalensen lehet kikötni. [3] [8]



**4.3. ábra:** Sematikus ábra az aminkapcsolás mechanizmusáról a Thermo Fisher protokollja alapján, amikor az EDC/NHS aktiváció után a ligandum kötődése történik meg. [i6] [i7]

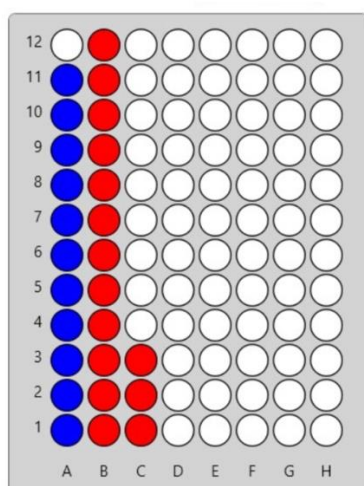


pozíció	anyag	térfogat
<i>A1</i>	EDC/NHS	105 µl
<i>B1</i>	etanolamin	105 µl
<i>C1</i>	ligandum	217 µl

**4.4 ábra:** Az immobilizációhoz felhasznált anyagok elrendezése az automata mintaadagoló rendszerben.

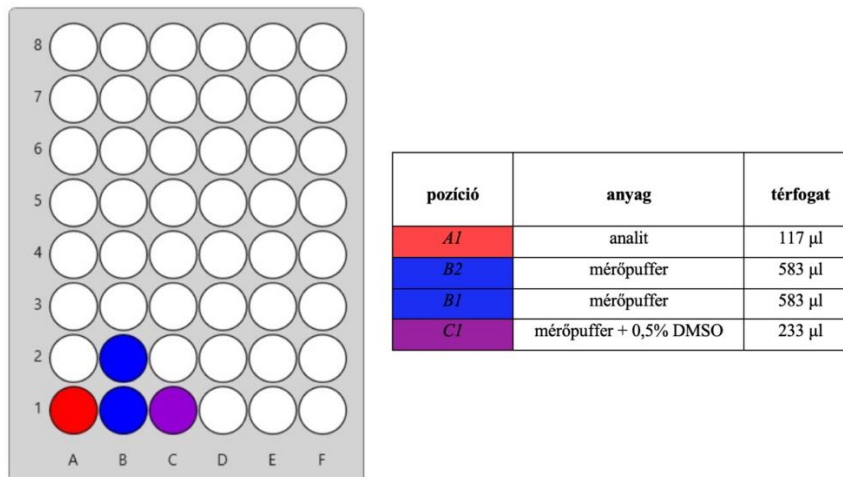
#### 4.7.4 Kinetika

A kinetikai széria minden esetben a hagyományos (4.5. ábra) , több koncentrációval végzett, így részletesebb kinetika információkat szolgáltat, vagy a RAPID (4.6. ábra) , egy koncentrációval végzett, viszont jóval kisebb időigényű kinetikával végzett kísérlet-megfigyelést foglalja magába. A kinetikai szériában történik meg az adott analit injektálása a chip csatornáira, ezáltal létrehozva az analit-ligand közötti kölcsönhatást, melyet valós-időben követhetünk a WAVEcontrol programban.



pozíció	anyag	térfogat
<i>A1</i>	mérőpuffer	350 µl
<i>A2</i>	mérőpuffer	350 µl
<i>A3</i>	mérőpuffer	350 µl
<i>A4</i>	mérőpuffer	350 µl
<i>A5</i>	mérőpuffer	350 µl
<i>A6</i>	mérőpuffer	350 µl
<i>A7</i>	mérőpuffer	350 µl
<i>A8</i>	mérőpuffer	350 µl
<i>A9</i>	mérőpuffer	350 µl
<i>A10</i>	mérőpuffer	350 µl
<i>A11</i>	mérőpuffer	350 µl
<i>A12</i>	mérőpuffer	350 µl
<i>B1</i>	analit	350 µl
<i>B2</i>	analit	350 µl
<i>B3</i>	analit	350 µl
<i>B4</i>	analit	350 µl
<i>B5</i>	analit	350 µl
<i>B6</i>	analit	350 µl
<i>B7</i>	analit	350 µl
<i>B8</i>	analit	350 µl
<i>B9</i>	analit	350 µl
<i>B10</i>	analit	350 µl
<i>B11</i>	analit	350 µl
<i>B12</i>	analit	350 µl
<i>C1</i>	analit	350 µl
<i>C2</i>	analit	350 µl
<i>C3</i>	analit	350 µl

**4.5. ábra:** Hagományos kinetikai módban a felhasznált anyagok elrendezése az automata mintaadagoló rendszerben.



**4.6. ábra:** RAPID kinetikai módban a felhasznált anyagok elrendezése az automata mintaadagoló rendszerben.

#### 4.7.5 Kísérleti eredményül kapott kinetikai paraméterek

A kísérletek kiértékelése nagyon egyszerűen, néhány kattintással elvégezhető a WAVEcontrol programban. A kiértékelés során különféle, analit-ligand közötti molekuláris kölcsönhatást leíró kinetikai paramétereket [8], tudunk meghatározni:

$R_{\max}$ : a szenzorgram azon maximális válasza  $\text{pg}/\text{mm}^2$ -ben kifejezve, amely azzal áll összefüggésben, hogy az adott analit az összes ligand-kötőhelyhez bekapcsolódott-e.

$k_a$ : az asszociációs sebességi állandó, mely az analit ligandhoz való kötődésének sebességét fejezi ki  $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  mértékegységben.

$k_d$ : a disszociációs sebességi állandó, mely az analit ligandummal alkotott komplexének a bomlási sebességét  $\text{s}^{-1}$ -ban mutatja.

$K_D$ : úgynevezett egyensúlyi disszociációs konstans, mely azt az analitkoncentráció-értéket jelöli, melynél egyensúlyi állapotban az analit a ligandkötőhelyeknek éppen a felét foglalja el. A konstans  $k_a/k_d$  képplettel, M-ban mérve kerül számításra. [8]

#### *4.7.6 Blankek szerepe*

A mérések során úgynevezett „blankeket”, vakpróbákat is alkalmaztunk, melyek az apróbb eltérések, torzítások kiküszöbölését szolgálják. Definíciójuk szerint a minta áramoltatásával közel azonos, de analit nélküli injektálások. Ebből triviális módon következik, hogy a vakpróbát pontosan ugyanazzal a pufferrel kell végezni, mint ami az analit készítése során került felhasználásra. Méréseink során minden 5. minta injektálás után alkalmaztunk blanket. A blanket injektálása során kapott jelek kivonásra kerülnek a minta injektálási ciklusaiból, ez az úgynevezett kettős referencia alkalmazása, mely az eltérések eliminálásnak rendkívül hatékony módszere a kiértékelésben. [8]

#### *4.7.7 DMSO kalibráció szerepe*

A kinetikai kölcsönhatás vizsgálat alanyai a legtöbb esetben vízben nehezen vagy nem oldható anyagok, így apoláris oldószerben, DMSO-ban kerülnek beoldásra. Emiatt a mérőpufferbe is mérünk DMSO-t, és ezért szükséges a DMSO kalibráció is a kiértékelés során. A korrekció abból a célból szükséges, mivel a referenciacsatorna sokkalta érzékenyebb az oldat törésmutatójának megváltozására. Mindez pedig annak köszönhető, hogy azon fehérjét nem immobilizálunk. Ez az úgynevezett missing volume effect. [8]

## 5. Eredmények és értékelésük

### 5.1 Fetuin glikoprotein hasítása PNGáz F glikozidáz enzimmel

#### 5.1.1 Immobilizáció

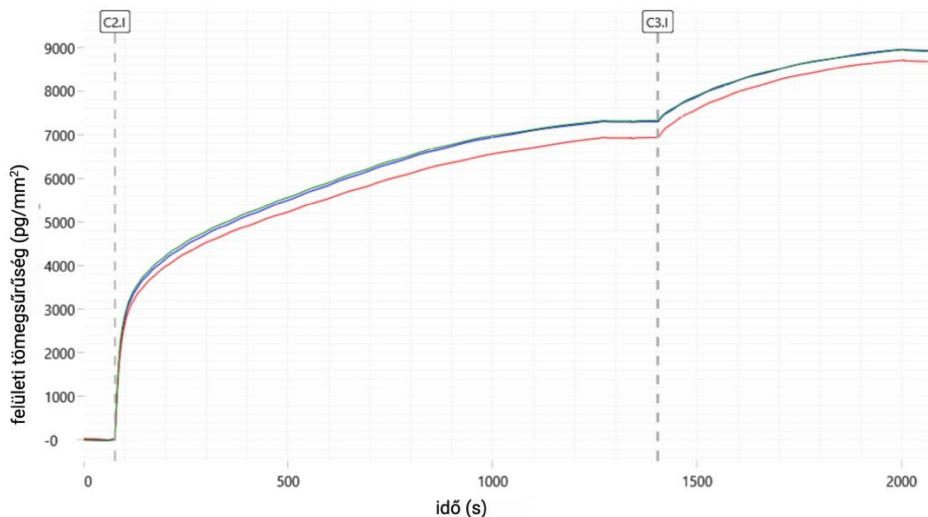
Az immobilizációs széria során a fetuin glikoproteint a 4-PCP chip 1-es, 2-es, és 3-as csatornáján immobilizáltuk, az előbbieken említett módon kovalensen kötöttük EDC/NHS reagens és 1 M-os etanolamin segítségével a chip felületre. Az immobilizációhoz 50 mM-os koncentrációjú  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$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

Az 5.1-es ábrán jól megfigyelhető, hogy az 1-es csatornán  $8935 \text{ pg}/\text{mm}^2$ , a 2-es csatornán  $8662 \text{ pg}/\text{mm}^2$ , a 3-as csatornán pedig szintén  $8902 \text{ pg}/\text{mm}^2$  felületi tömegsűrűségű fetuin kötődött kovalensen a chipfelületre a kísérlet immobilizációs művelete során.

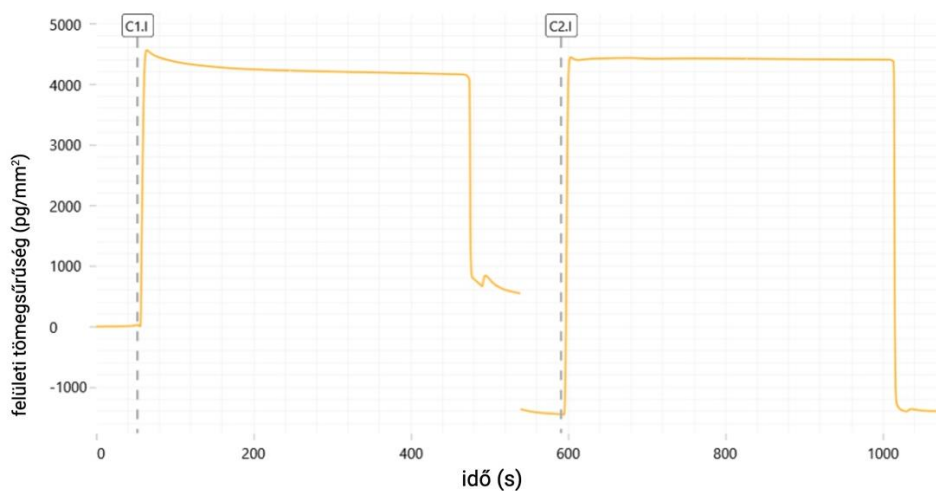
A 4-es csatorna (5.2. ábra) a mérések során referencia-csatornaként került alkalmazásra, ezen csak aktiválás és passziválás ment végbe, immobilizáció nem. Az aktiváció során aktívvá tettük a chip felületét, hogy minél nagyobb mennyiségű fetuin protein tudjon kovalensen odakötődni. A passziválás keretében pedig a szabadon maradt kötőhelyeket zártuk le, hogy további kötődés a felületre már ne tudjon megvalósulni.

pozíció	anyag	térfogat
A1	EDC/NHS	105 $\mu\text{l}$
B1	etanolamin	105 $\mu\text{l}$
C1	FtsZ	400 $\mu\text{l}$

5.1. táblázat: A fetuin immobilizációjához használt anyagok és térfogatok.



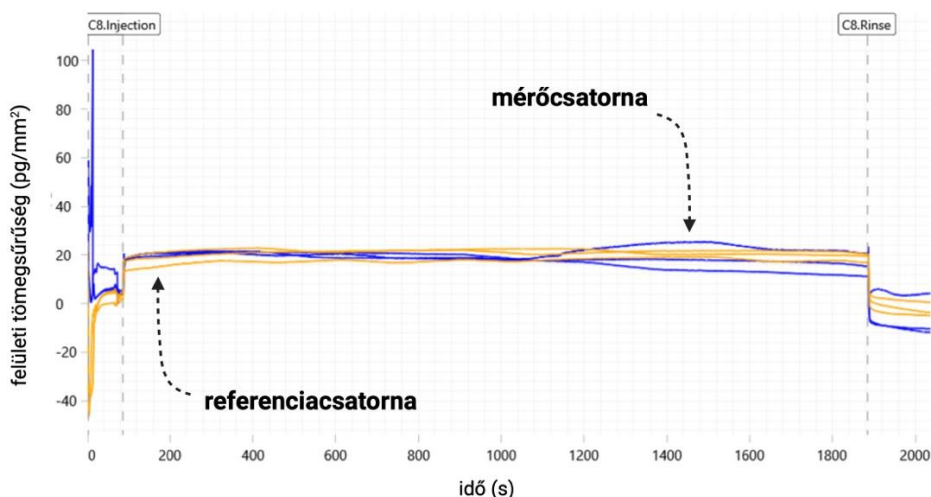
**5.1. ábra:** A fetuin immobilizációs görbéje a felületi tömegsűrűség és az idő függvényében feltüntetve (1-es csatorna kék, 2-es piros, 3-as zöld színnel szerepel).



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

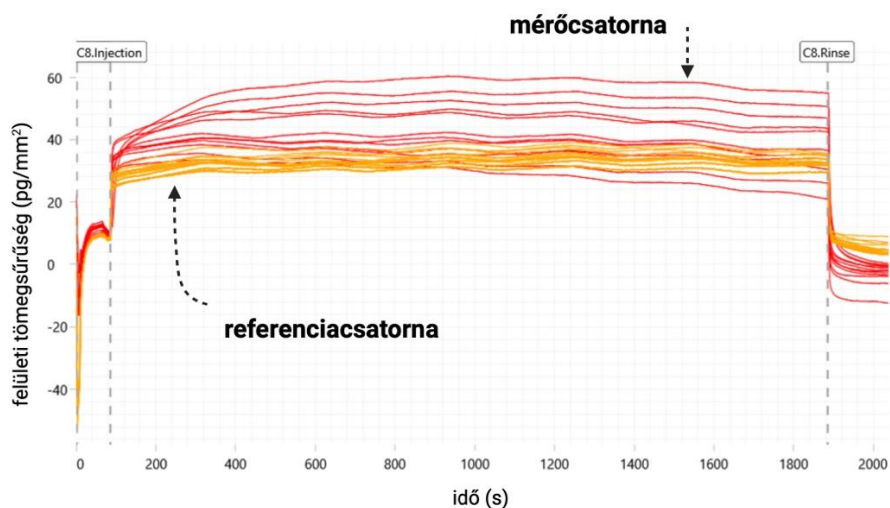
### 5.1.2 Kinetika

Az 1-es csatornán 1-szeres PBS-oldatot alkalmaztunk pufferként és PNGáz F enzim 50-szeres hígítással készített oldatát használtuk (5.3. ábra). Utóbbi 15 ciklus során áramoltattuk az 1-es csatornán. Az asszociációs idő 1800 s volt, míg a disszociációs idő pedig 150 s. Az asszociáció az injektálást, a disszociáció pedig mosási lépést foglal magába. Sajnos a mérés során előfordult, hogy egyes ciklusok során levegőbuborék került injektálásra a felületre, ezen ciklusokat a kiértékelés során figyelmen kívül kellett hagynunk.



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

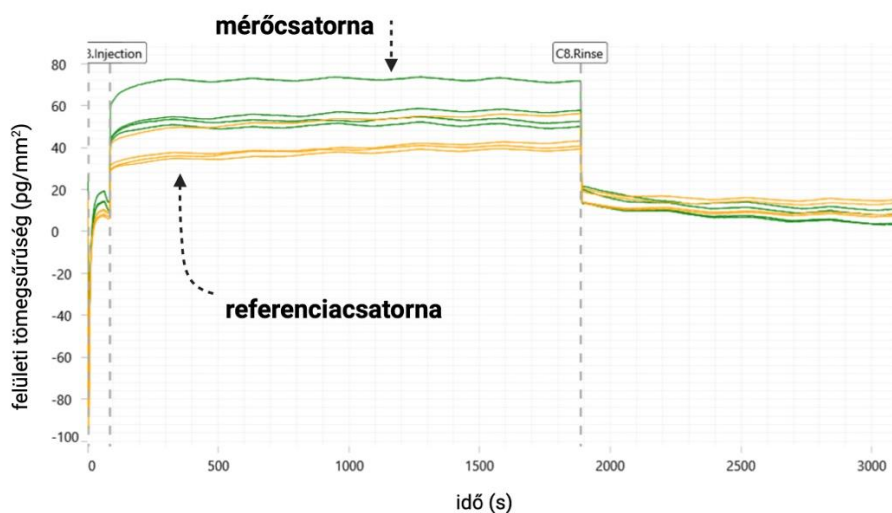
A 2-es csatornán 1-szeres töménységű PBS-oldatot alkalmaztunk, mint puffer és az enzim 20-szorosára hígított koncentrációját áramoltattuk a chip 2-es és 4-es csatornáján. Az asszociációs idő ezen csatorna esetében is 1800 s, a disszociációs idő pedig 150 s volt. A 4-es csatorna ebben az esetben is referencia-csatorna szerepet töltött be, tehát kizárólagosan aktiválás és passziválás történt rajta, immobilizációt nem végeztünk (5.4. ábra).



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

A 3-as csatorna esetében az enzim tömény oldatát alkalmaztuk, és szintén 1-szeres PBS-oldat volt a pufferünk. Az enzim 5 ciklusban lett injektálva a 3-as és 4-es csatornára. Az asszociációs idő 1800 s-ra, a disszociációs 1200 s-ra lett beállítva (5.5. ábra).

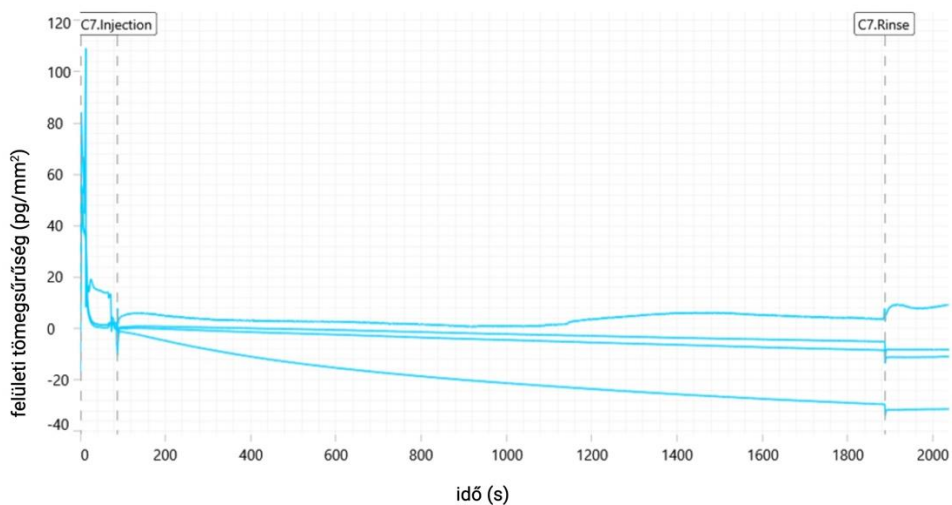




**5.5. ábra:** A 3-as és a 4-es csatorna az enzimátikus hasítás után a felületi tömegsűrűség és az idő függvényében ábrázolva (a 3-es csatorna zölddel, a 4-es csatorna sárga színnel szerepel).

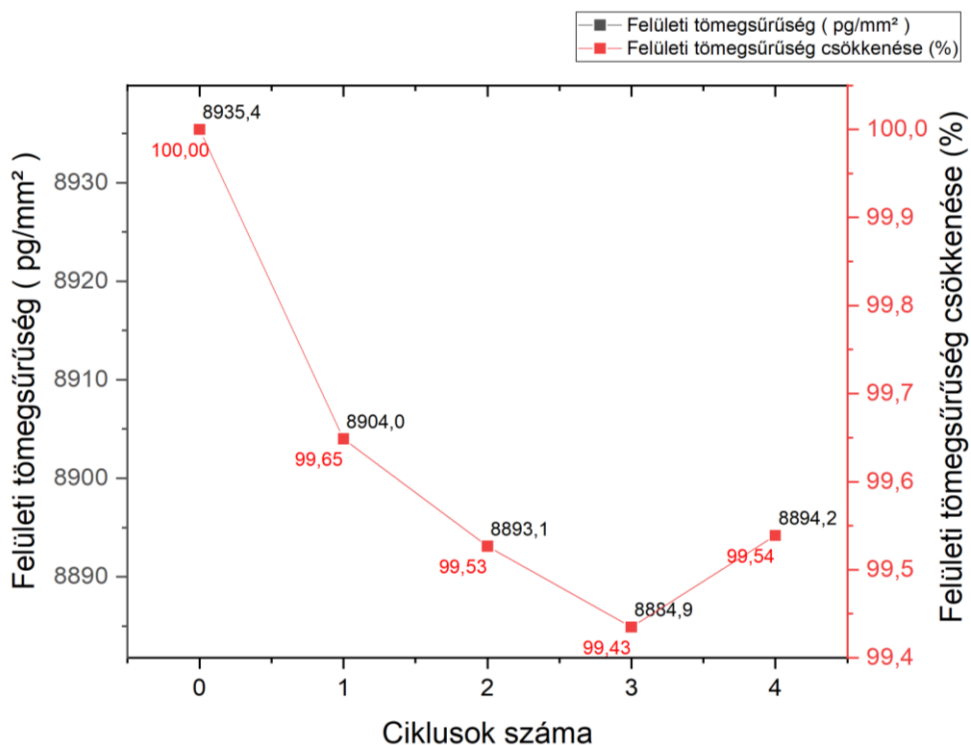
### 5.1.3 Eredmények és értékelésük

Az 1-es csatorna kísérleti adatainak WAVEcontrol program segítségével végzett kiértékelése során megállapítottuk, hogy a felületen immobilizált fetuin glikoprotein cukoregységeinek mennyisége  $-31,4 \text{ pg/mm}^2$ -re csökkent az 1. ciklus során, majd ciklusról-ciklusra további csökkenést mutatott. Az 5.6. ábrán mindez jól megfigyelhető, és arra enged következtetni, hogy a PNGáz F enzimmel végzett enzimátikus hasítás eredményesnek tekinthető.



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

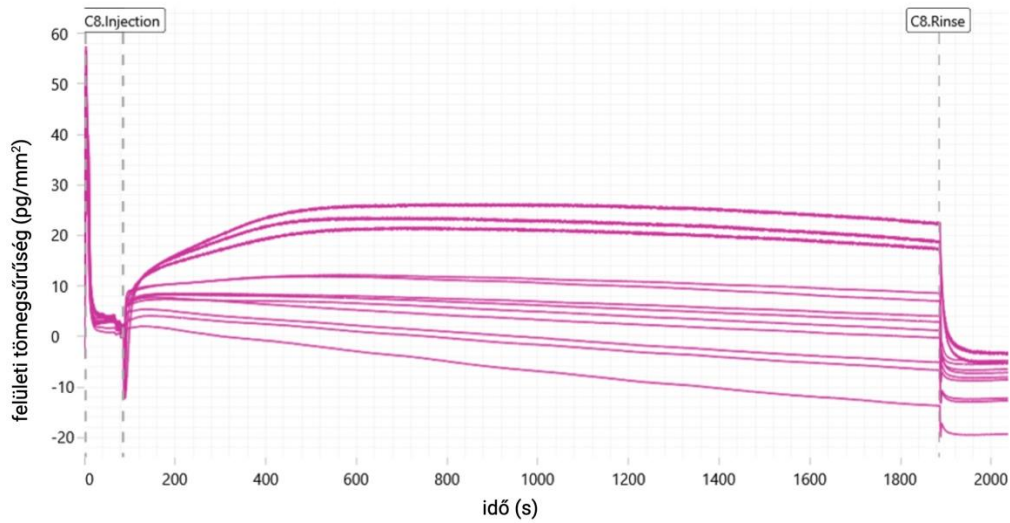




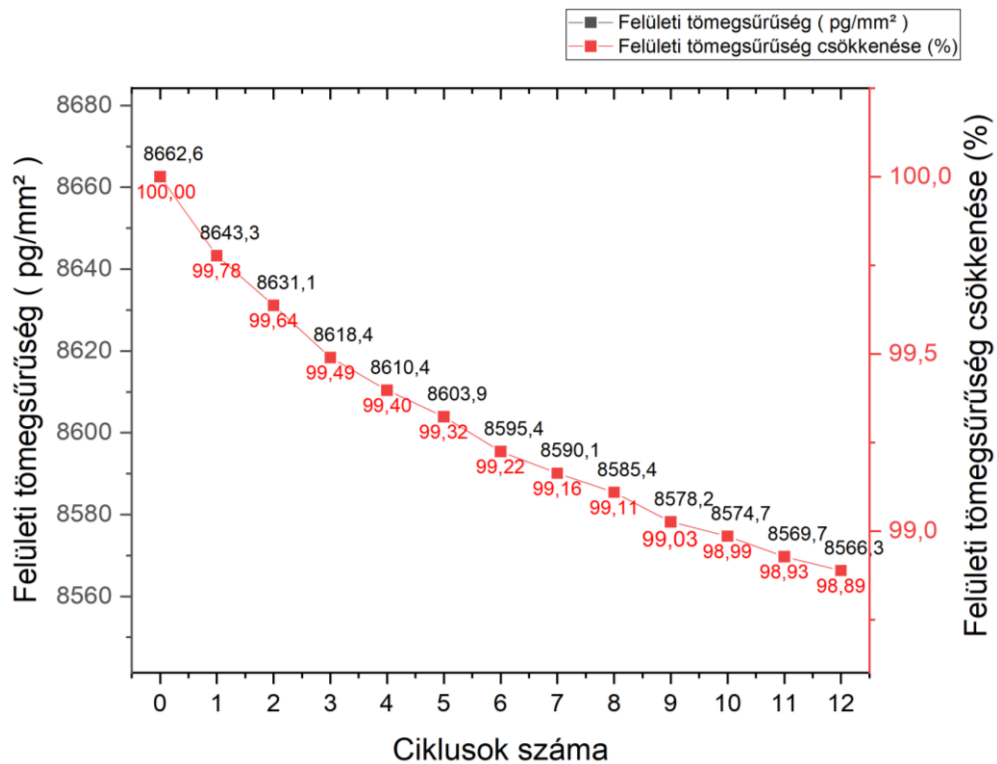
**5.7. ábra:** Diagram a fetuin cukoregységeinek ciklusról-ciklusra történő csökkenéséről, a felületi tömegsűrűség és a ciklusok számának függvényében ábrázolva.

Az 5.7. ábrán jól látható, hogy az 1-es csatornán a glikoprotein szénhidrát egységeinek felületi tömegsűrűsége az egymást követő ciklusok során egyre csökkenő tendenciát mutatott. Az utolsó ciklus végén a glikozidáz enzim hatására a felületi tömegsűrűség 8894,2 pg/mm<sup>2</sup> értékű lett.

A 2-es csatorna esetében a referencia-csatornával korrigált görbék alapján megállapítható, hogy a felületre kovalensen kötött fehérje szénhidrát unitjainak mennyisége -19,3 pg/mm<sup>2</sup>-re csökkent (5.8. ábra) az 1. ciklus során, majd ezt követően ciklusról-ciklusra egyre kisebb volt a felületi tömegsűrűségben észlelhető csökkenés. Ez a felületi tömegsűrűségben tapasztalható változás szintúgy a PNGáz F glikozidáz enzim eredményes hasító hatását támasztja alá.



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

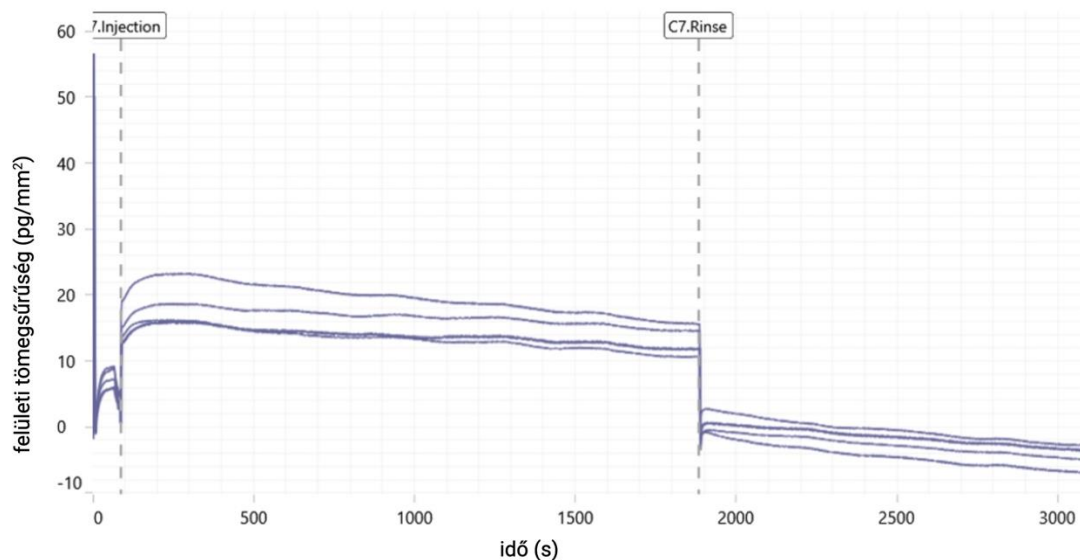


5.9. ábra: Diagram a fetuin cukoregységeinek ciklusról-ciklusra történő csökkenéséről, a felületi tömegsűrűség és a ciklusok számának függvényében ábrázolva.

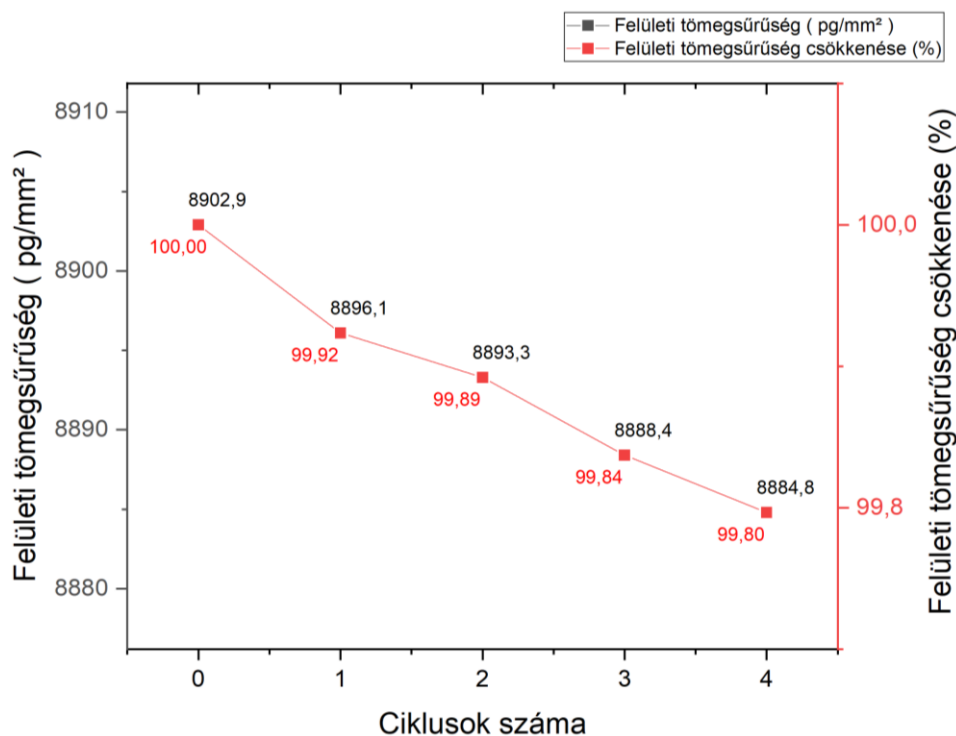
A 2-es csatornán minden ciklus után egyre kevesebb lett a glikoprotein cukoregységeinek felületi borítottsága, ami az 5.9. ábrán jól látható. Ebben az esetben kevesebb

ciklus során merült fel hiba a levegő buborékok miatt, így a kapott eredmények alapján jobban megfigyelhető a felületi tömegsűrűség csökkenése. Az utolsó ciklus végére a borítottság 8566,3 pg/mm<sup>2</sup>-re csökkent.

A 3-as csatornán végzett hasítás kiértékelése során, a kapott eredmények referencia-csatornával végzett korrigálása során azt állapítottuk meg, hogy a fetuin glikoprotein cukoregységeinek felületi tömegsűrűsége -6,8 pg/mm<sup>2</sup> értékre csökkent az 1. ciklus során, és ciklusról-ciklusra egyre kisebb lett ez az érték. Mindez arra enged következtetni, hogy glikozidáz F enzim ebben az esetben is hatékonynak bizonyult. A kapott értékek az alábbi, 5.10. ábrán figyelhetőek meg.



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



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

Az 5.11. ábrán figyelhető meg mérésünk során a 3-as csatornán bekövetkező, ciklusonkénti szénhidrát egység felületi tömegsűrűségének csökkenő tendenciája. Az utolsó ciklus végére a felületi borítottság  $8884,8 \text{ pg/mm}^2$  értékre redukálódott a PNGáz F enzim hasítása révén.

Összességében elmondható, hogy a fetuin glikoprotein hasítását vizsgáló kísérletek alapozó jellegűek, egy új területen megtett első lépéseket foglalják össze a laboratóriumunkban korábban fejlesztett és ma már kereskedelmi forgalomba került GCI műszerrel. Mindezek után az egyes szénhidrát egységek molekuláris kötéseket betöltött szerepét is kívánjuk még vizsgálni a GCI műszerrel. Így az alegységek lehasítása és a további molekuláris affinitásvizsgálatok is ugyanazon chipen történnének. Célunk még vírus burokfehérjék és más hasító enzimek tanulmányozása is.

## 5.2 FtsZ fehérje és NCR247 peptid kölcsönhatásának vizsgálata

### 5.2.1 Immobilizáció

Annak okán, hogy a FtsZ fehérje és az NCR247 peptid közötti molekuláris kölcsönhatást leíró kinetikai paraméterek tekintetében nem rendelkezünk előzetes információval, a RAPID mérési felállással, és az 'intermediate binders' opcióval kezdtük meg a kísérletezést.

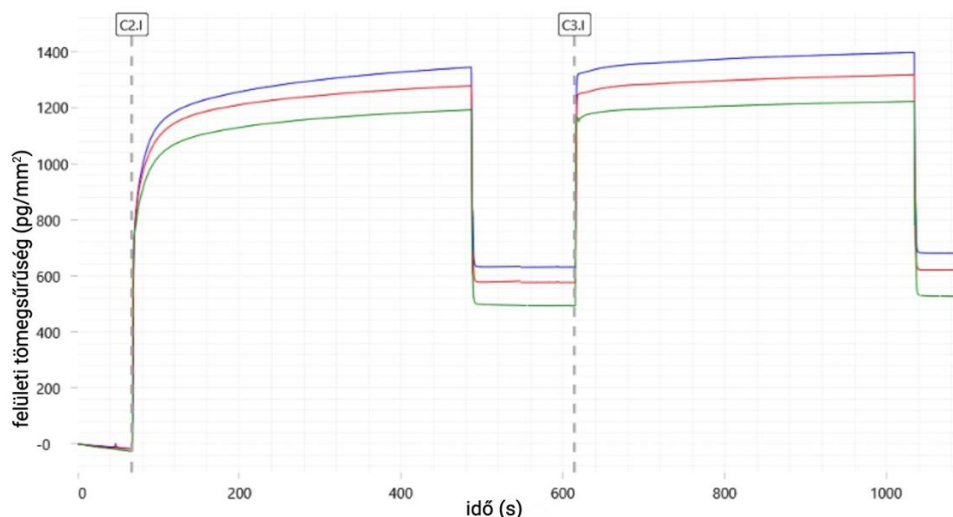
A mérés elején elvégeztük a deszorpciós műveletet a műszerben lévő, még előző méréshez használt chipen. Ennek keretében 0,5%-os SDS-t, glicint, illetve MQ-vizet áramoltattunk a chip csatornáin, ezt követően új, PCP-típusú chip került behelyezésre, és elvégeztük a kondicionálási szériát.

Az immobilizációhoz használt FtsZ-fehérjeoldat kiindulási koncentrációja 1 mg/ml volt, melyet a Szegedi Tudományegyetemről kaptunk. Ennek tízszeres hígítását készítettem el, így a fehérje 0,1 mg/ml koncentrációjú oldata került felhasználásra, melyet két ciklusban injektáltunk a chip 1-es, 2-es és 3-as mérőcsatornáin 420 s-os injektálási és 60 s-os mosási időekkel. A szériához felhasznált anyagok és térfogattömegeik az 5.3. táblázatban figyelhető meg. Pufferként kálium-foszfát-oldatot alkalmaztunk.

Az immobilizációs szériában az 1-es mérőcsatornán  $696 \text{ pg/mm}^2$ , a 2-es mérőcsatornán  $640 \text{ pg/mm}^2$ , míg a 3-ason  $550 \text{ pg/mm}^2$  felületi tömegsűrűségű FtsZ fehérjét sikerült kikötni a chipfelületre. (5.12. ábra)

pozíció	anyag	térfogat
A1	EDC/NHS	105 $\mu\text{l}$
B1	etanolamin	85 $\mu\text{l}$
C1	FtsZ	240 $\mu\text{l}$

5.2. táblázat: Az FtsZ immobilizációjához használt anyagok és térfogatok.



**5.12. ábra:** Az FtsZ fehérje immobilizációs görbéi. (Az 1-es csatorna kék, a 2-es csatorna piros, míg a 3-as csatorna zöld színnel szerepel.)

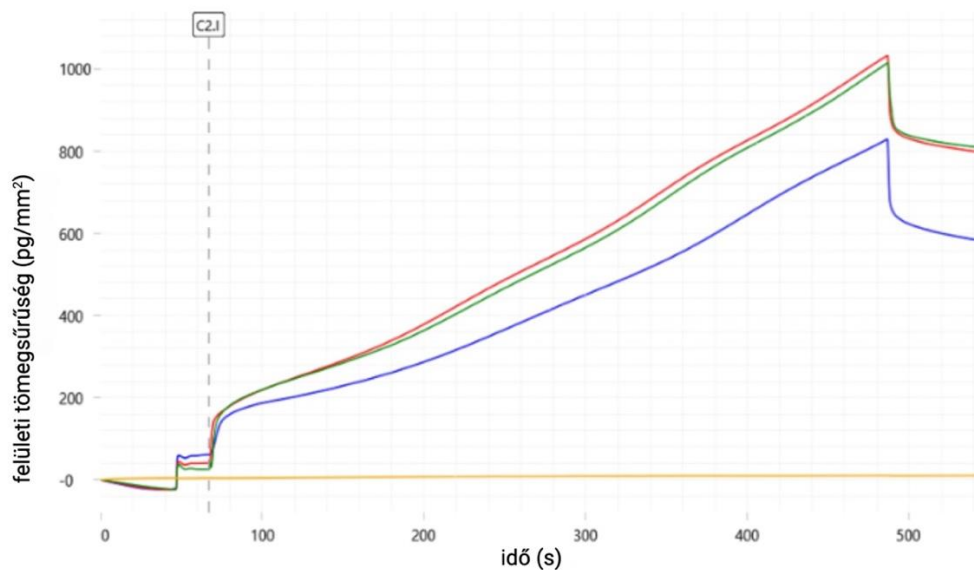
A kapott kinetikai eredmények (rendkívül magas  $R_{max}$ -,  $K_D$ -paraméterek) arra utaltak, hogy az FtsZ fehérje és az NCR297 peptid közötti kölcsönhatás 'tight binders' kategóriába esik. Eddigi méréseink során kontroll mérések keretében a furoszemid kötődését vizsgáltuk a chipfelületre immobilizált karbon-anhidráz vonatkozásában, mely kölcsönhatás az 'intermediate binders' kategóriába esik. Így szükségessé vált olyan kontrollmolekulával tesztelni a rendszert, mely tight binders. Az acetazolamidra esett a választásunk, mely vegyület különböző koncentrációival végeztünk méréseket a kölcsönhatás még hatékonyabb kinetikai feltérképezése érdekében.

A mérés elején új PCP-chip került a műszerbe, és elvégeztük a szokásos deszorpciós és kondicionálási műveletet. A karbon-anhidrázt szintúgy a már ismertetett aminkapcsolással rögzítettük a chip mérőcsatornáinak felületére, és a 4-es csatornán aktiválást és passziválást végeztünk, hogy a mérés során referencia-csatornaként használhassuk (5.4. táblázat).

Az 1-es mérőcsatornán  $529 \text{ pg/mm}^2$ , a 2-es mérőcsatornán  $761 \text{ pg/mm}^2$ , míg a 3-ason  $784 \text{ pg/mm}^2$  felületi tömegsűrűségű karbon-anhidrázt sikerült kikötni a chipfelületre.

pozíció	anyag	térfogat
A1	EDC/NHS	105 $\mu\text{l}$
B1	etanolamin	85 $\mu\text{l}$
C1	karbon-anhidráz	120 $\mu\text{l}$

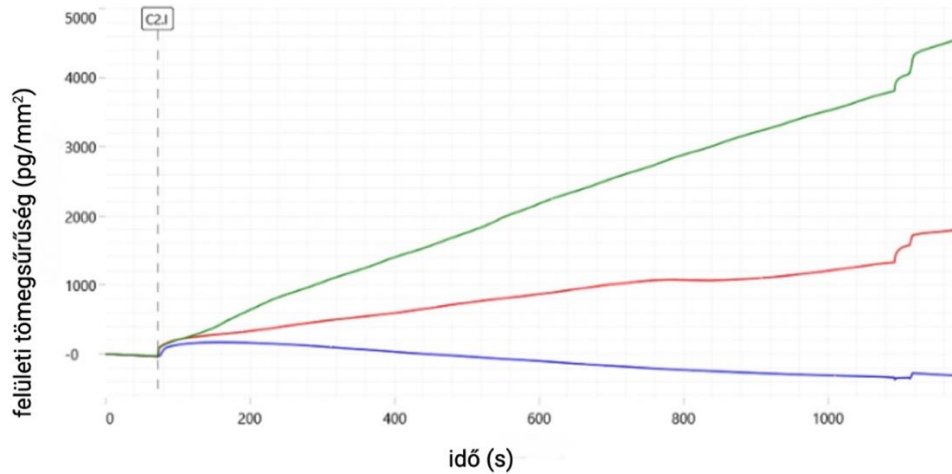
**5.3. táblázat:** A karbon-anhidráz immobilizációjához használt anyagok és térfogatok.



**5.13. ábra:** A karbon-anhidráz immobilizációs görbéje (Az 1-es mérőcsatorna kék, 2-es mérőcsatorna piros, míg a 3-as mérőcsatorna zöld színnel szerepel).

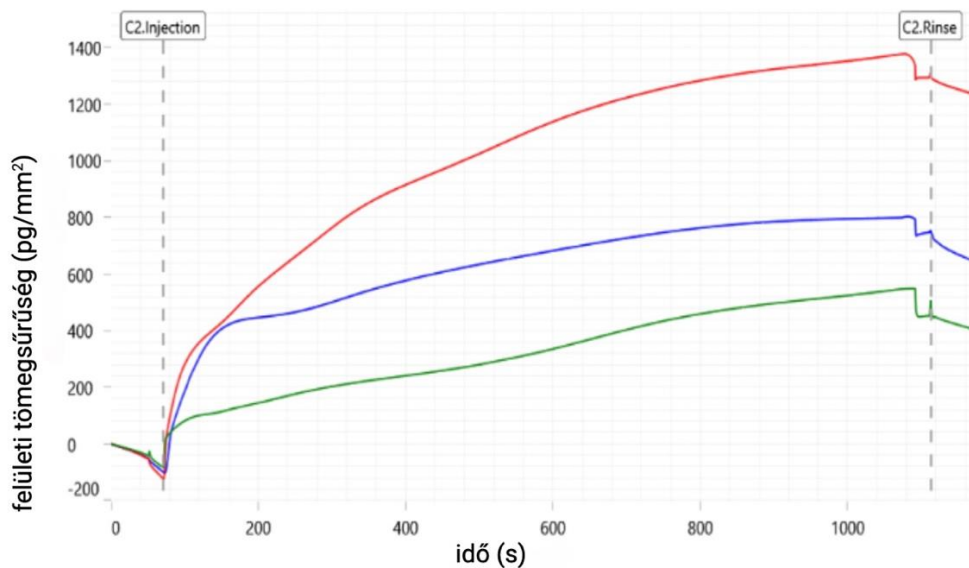
A kezdeti mérések során nem sikerült magas felületi tömegsűrűséget elérni, így sok fehérjét kikötni a PCP-chip felületre. A felületi tömegsűrűség mennyiségének növelésére több lehetőség is felmerült. Egyrészt a PCH-chip alkalmazása, mely nagyobb kötődési felületet biztosít, másrészt a kötéskémia reagenseinek újbóli elkészítése, mert azok frissessége kritikus fontosságú a hatékony aktiváláshoz az immobilizációs szériában.

Még az új, PCH-chip behelyezése előtt deszorpciós művelet futott, majd a chip behelyezését követő kondicionálás. Az előzőekhez hasonló módon, az immobilizációs szériában ugyanazon anyagokkal és térfogatokkal, az aminkapcsolással rögzítettük az FtsZ fehérjét a mérőcsatornákon. A 2-es mérőcsatornán  $1809 \text{ pg/mm}^2$ , a 3-ason pedig  $4531 \text{ pg/mm}^2$  felületi tömegsűrűségű fehérjét sikerült kikötni kovalensen.



**5.14. ábra:** Az FtsZ fehérje immobilizációs görbéi PCH chipen. (Az 1-es mérőcsatorna kék, a 2-es mérőcsatorna piros, míg a 3-as mérőcsatorna zöld színnel szerepel).

Végül a frissen készített EDC/NHS reagensekkel is végeztünk még mérést a fehérje-peptid kölcsönhatás vizsgálatát illetően. A szokásos műveletek után, az eddig alkalmazott anyagokkal és térfogatokkal az immobilizációban az 1-es csatornára 733  $\text{pg/mm}^2$ , a 2-esre 1338  $\text{pg/mm}^2$ , míg a 3-as mérőcsatornára 475  $\text{pg/mm}^2$ -nyi FtsZ-t sikerült kikötni (5.15. ábra).



**5.15. ábra:** Az FtsZ fehérje immobilizációs görbéi frissen készített EDC/NHS reagensek használatát követő immobilizáció során. (Az 1-es mérőcsatorna kék, a 2-es mérőcsatorna piros, míg a 3-as mérőcsatorna zöld színnel szerepel).



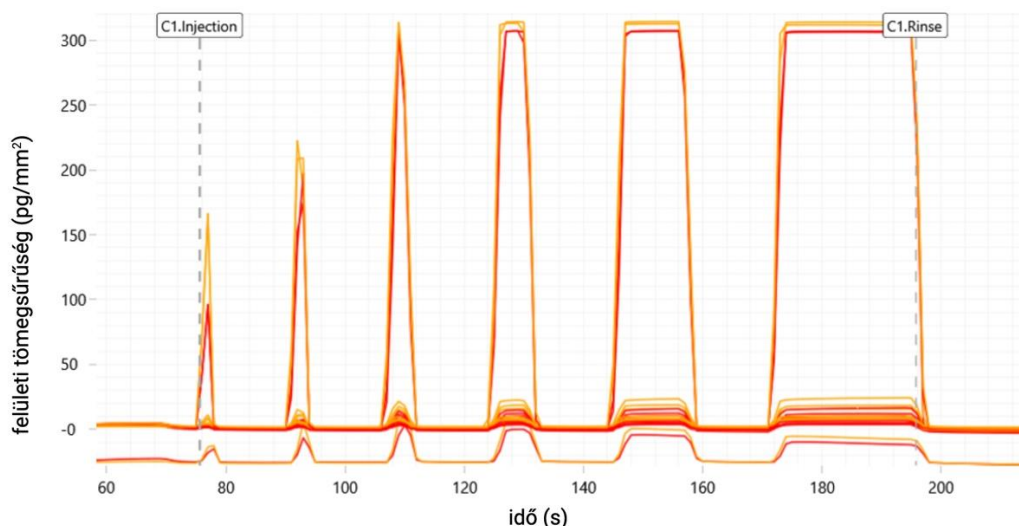
### 5.2.2 Kinetika

A NCR-peptidoldatokat a Szegedi Tudományegyetemről kaptuk. A kísérletezést az NCR247 peptid vizsgálatával kezdtük el. Az első mérés kinetikai szériában a peptid különböző koncentrációit injektáltuk a csatornákra.

Az első alkalmazott koncentráció 1 nM volt, amit a kiindulási 2 mM-os oldat kétezerszeres hígításával készítettem el, mégpedig kettő lépésben. Elsőként egy 500  $\mu$ M koncentrációjú oldatot csináltam négyszeres hígítással, melyet tovább hígítottam 1  $\mu$ M-osra. A hígításokat 20 mM-os, pH 7-es kálium-foszfát-pufferrel végeztem, amely a mérés mérőpufferjeként funkcionált.

<b>pozíció</b>	<b>anyag</b>	<b>térfogat</b>
<i>A1</i>	NCR247	117 $\mu$ l
<i>B2</i>	kálium-foszfát puffer	583 $\mu$ l
<i>B1</i>	kálium-foszfát puffer	583 $\mu$ l
<i>C1</i>	kálium-foszfát puffer + 0,5% DMSO	233 $\mu$ l

**5.4. táblázat:** A kinetikához használt anyagok és térfogatok.



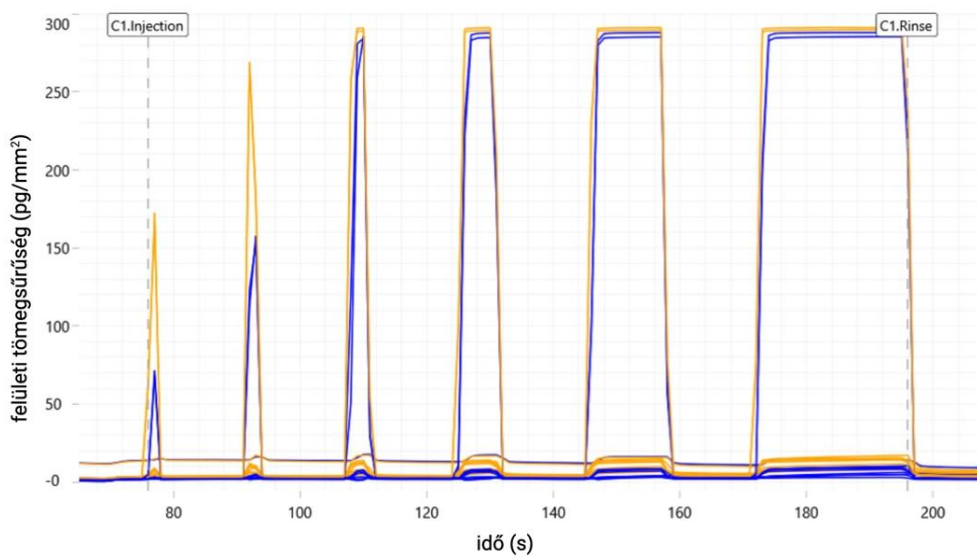
**5.16. ábra:** Az 1  $\mu\text{M}$ -os NCR247-koncentrációval végzett RAPID-mérés során kapott korrekció nélküli kísérleti eredmények az FtsZ és az NCR247 kölcsönhatásának vizsgálata során. (A 2-es, mérőcsatorna pirossal, míg a 4-es referenciacsatorna sárga színnel szerepel.)

A kísérleti adatok kiértékelése során kiderült, hogy a kötés jóval erősebb, mint azt gondoltuk, és a tight binders opció alkalmazásával lenne érdemes próbálkozni.

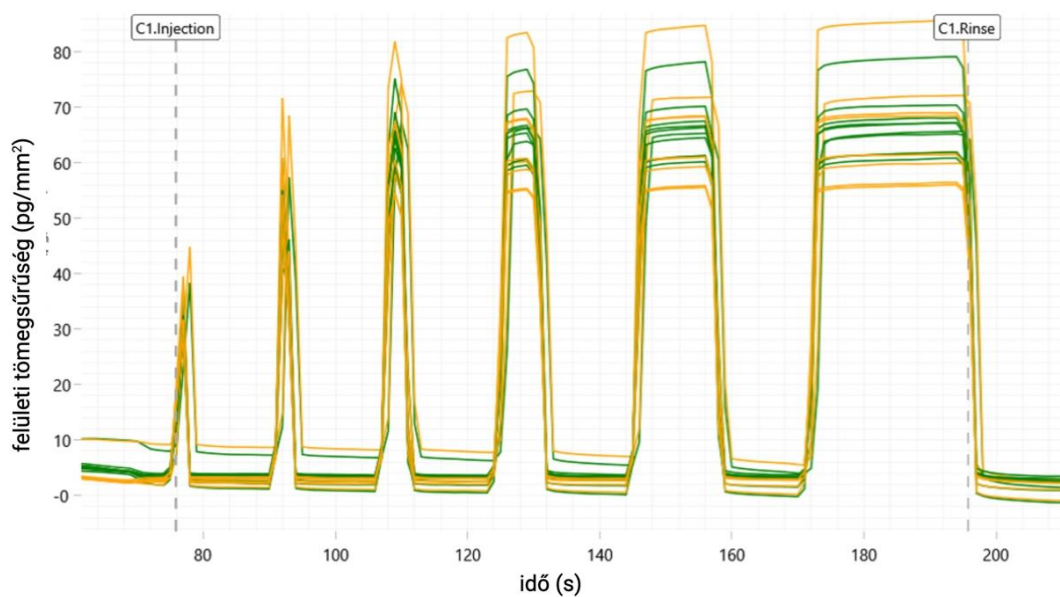
A karbon-anhidráz II-vel erősen kölcsönható acetazolamidot választottuk kontroll molekulának az előkísérletek végzéséhez. Ezen vegyületek közötti kölcsönhatás vizsgálatára több RAPID mérést is végeztünk, különböző, 100 nM-os- illetve 50 nM-os koncentrációkkal. Emellett hagyományos kinetika keretében is kísérleteztünk az anyagokkal. A mérés után kapott, korrekció nélküli görbék az 5.17., illetve 5.18. ábrán figyelhetők meg.

pozíció	anyag	térfogat
A1	acetazolamid	117 $\mu\text{l}$
B2	tömény PBS-oldat	583 $\mu\text{l}$
B1	tömény PBS-oldat	583 $\mu\text{l}$
C1	tömény PBS-oldat + 0,5% DMSO	233 $\mu\text{l}$

**5.5. táblázat:** A RAPID kinetikához használt anyagok és térfogatok.



**5.17. ábra:** A 100 nM-os acetazolamid koncentrációval végzett RAPID kinetikával végzett mérés után kapott, korrekció nélküli görbék a CAII és az acetazolamid kölcsönhatásának vizsgálata során. (Az 1-es, mérőcsatorna késsel, míg a 4-es referenciacsatorna sárga színnel szerepel.)

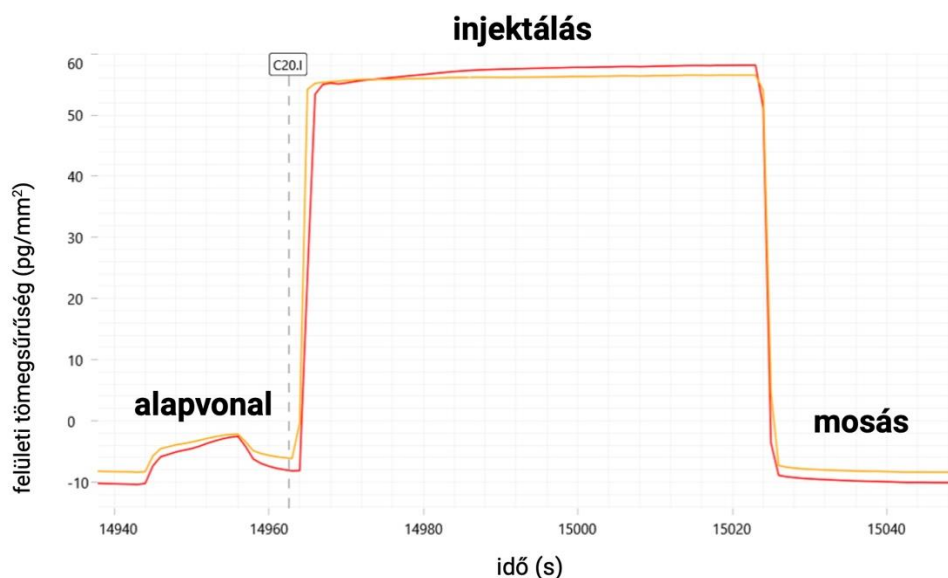


**5.18. ábra:** Az 50 nM-os acetazolamid koncentrációval végzett RAPID kinetikával végzett mérés után kapott, korrekció nélküli görbék a CAII és az acetazolamid kölcsönhatásának vizsgálata során. (A 3-as, mérőcsatorna zölddel, míg a 4-es referenciacsatorna sárga színnel szerepel.)

A 2-es csatornán hagyományos, több koncentrációs mérés keretében áramoltattuk az acetazolamid vegyület oldatát, a 4-es csatorna pedig referenciacsatornaként funkcionált.

pozíció	anyag	térfogat
A1-A12	tömény PBS + 3% DMSO-mérőpuffer	80 µl
B1-B2	tömény PBS + 3% DMSO-mérőpuffer	80 µl
C1	100 nM acetazolamid	80 µl
C2	100 nM acetazolamid	80 µl
C3	50 nM acetazolamid	80 µl
C4	50 nM acetazolamid	80 µl
C5	25 nM acetazolamid	80 µl
C6	25 nM acetazolamid	80 µl
C7	12,5 nM acetazolamid	80 µl
C8	12,5 nM acetazolamid	80 µl
C9	6,25 nM acetazolamid	80 µl
C10	6,25 nM acetazolamid	80 µl
C11	3,125 nM acetazolamid	80 µl
C12	3,125 nM acetazolamid	80 µl
D1	1,5625 nM acetazolamid	80 µl
D2	1,5625 nM acetazolamid	80 µl
E1	mérőpuffer + 3% DMSO	80 µl
E2	mérőpuffer + 2,5% DMSO	80 µl
E3	mérőpuffer + 2% DMSO	80 µl
E4	mérőpuffer + 1,5% DMSO	80 µl
E5	mérőpuffer + 1% DMSO	80 µl

5.6. táblázat: A hagyományos kinetikához használt anyagok és térfogatok.

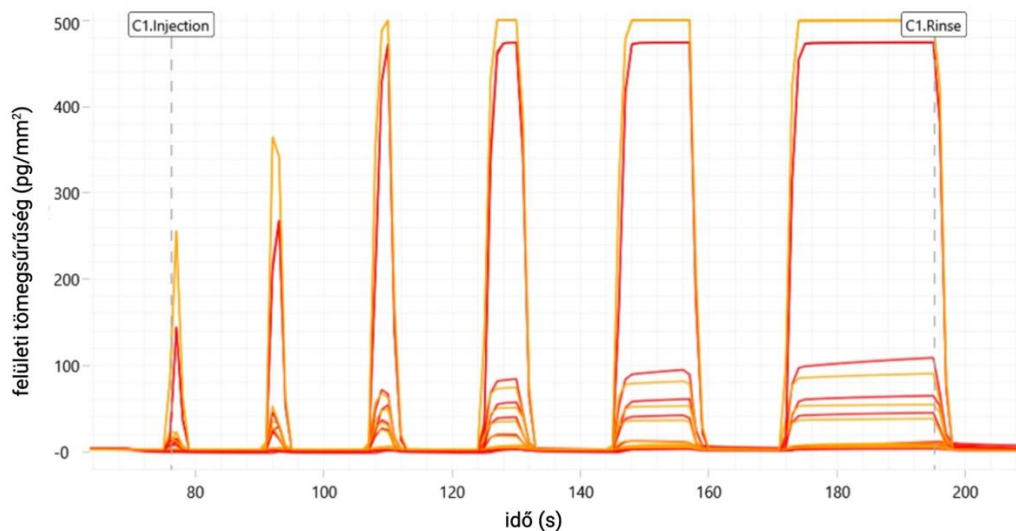


5.19. ábra: A hagyományos kinetikával végzett mérés után kapott görbék egy ciklus esetében, a CAII és az acetazolamid kölcsönhatásának vizsgálata során. (A 2-es mérőcsatorna piros, a 4-es referenciacsatorna sárga színnel szerepel.)

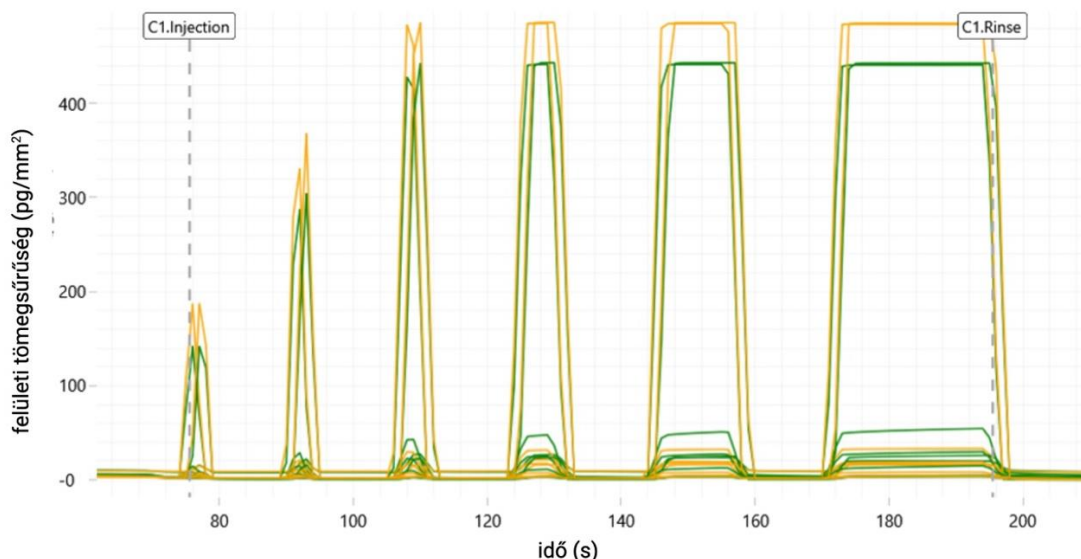
A PCH-chipen immobilizált FtsZ fehérjére több mérés keretében, 50 nM-os NCR247 peptid-oldatot injektáltunk a közöttük kialakuló kölcsönhatás kinetikai feltérképezése céljából. A mérések végén kapott, korrekció nélküli görbék 5.20 és 5.21. ábrán figyelhetőek meg.

pozíció	anyag	térfogat
A1	NCR247	117 $\mu$ l
B2	kálium-foszfát puffer	583 $\mu$ l
B1	kálium-foszfát puffer	583 $\mu$ l
C1	kálium-foszfát puffer + 0,5% DMSO	233 $\mu$ l

5.7. táblázat: A RAPID kinetikához használt anyagok és térfogatok.



5.20. ábra: Az 50 nM-os NCR247 peptid- koncentrációval végzett RAPID kinetikával végzett mérés után kapott, korrekció nélküli görbék az FtsZ és az NCR247 kölcsönhatásának vizsgálata során. (A 2-es, mérőcsatorna pirossal, míg a 4-es referenciacsatorna sárga színnel szerepel.)



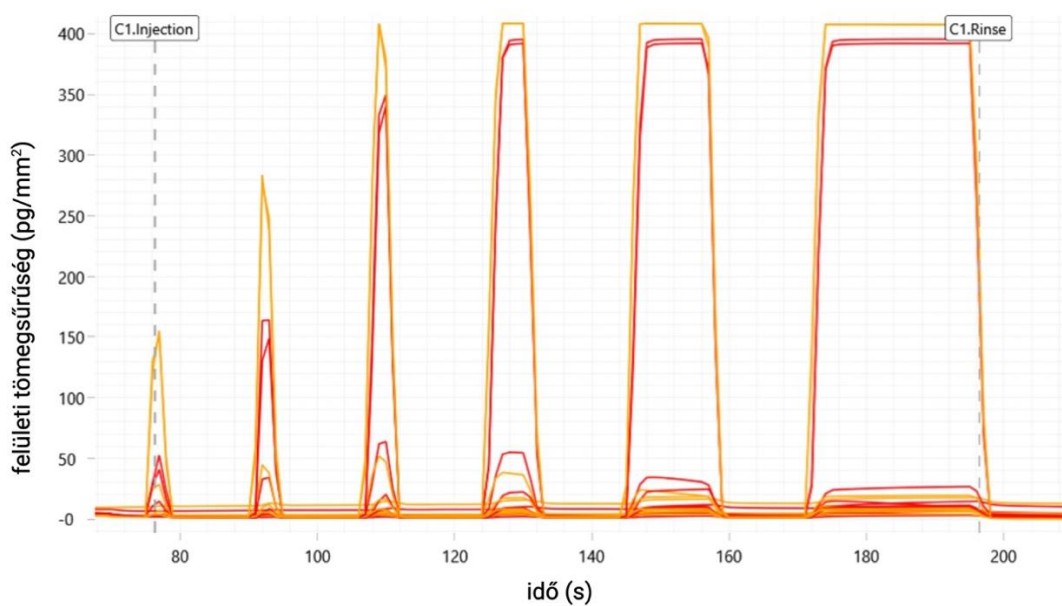
**5.21. ábra:** Az 50 nM-os NCR247 peptid-koncentrációval végzett RAPID kinetikával végzett mérés után kapott, korrekció nélküli görbék az FtsZ és az NCR247 kölcsönhatásának vizsgálata során. (A 3-as, mérőcsatorna zölddel, míg a 4-es referenciacsatorna sárga színnel szerepel.)

Végül egy, az előzőekhez hasonló mérés keretében 50 nM, illetve 100 nM peptid-koncentrációkkal ismét kísérleteztünk a közöttük kialakuló molekuláris kölcsönhatás vizsgálatának tárgykörében.

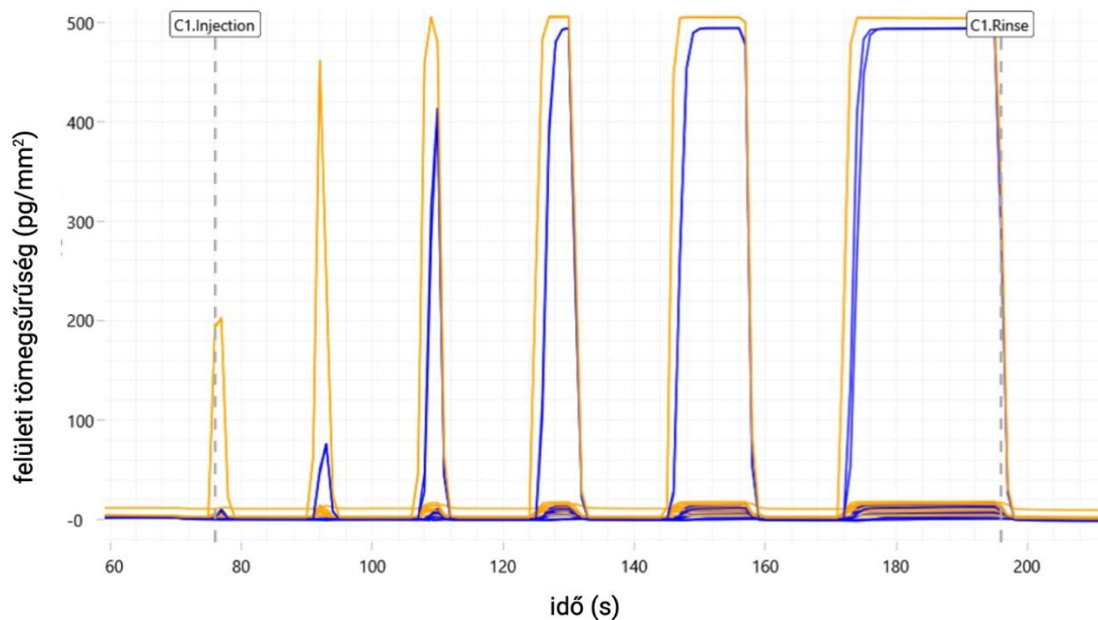
Az újonnan készített EDC/NHS reagensekkel és újabb PCH-chippel is végeztünk mérést, hogy még több adatunk legyen a fehérje-peptid kölcsönhatásra vonatkozólag. Az NCR247 peptid-oldat 50 nM-os és 100 nM-os koncentrációt alkalmaztuk a mérés során. A mérések során kapott, tipikus RAPID-görbék az 5.21 és 5.22. ábrán láthatóak.

pozíció	anyag	térfogat
A1	NCR247	117 $\mu$ l
B2	kálium-foszfát puffer	583 $\mu$ l
B1	kálium-foszfát puffer	583 $\mu$ l
C1	kálium-foszfát puffer + 0,5% DMSO	233 $\mu$ l

**5.8. táblázat:** A RAPID kinetikához használt anyagok és térfogatok.



5.22.ábra: 50 nM-os NCR247 peptid- koncentrációval végzett RAPID kinetikával végzett mérés után kapott, korrekció nélküli görbék az FtsZ és az NCR247 kölcsönhatásának vizsgálata során. ( A 2-es, mérőcsatorna pirossal, míg a 4-es referenciacsatorna sárga színnel szerepel.)



5.23. ábra: A 100 nM-os NCR247 peptid- koncentrációval végzett RAPID kinetikával végzett mérés után kapott, korrekció nélküli görbék az FtsZ és az NCR247 kölcsönhatásának vizsgálata során. (Az 1- es, mérőcsatorna kézzel, míg a 4-es referenciacsatorna sárga színnel szerepel.)

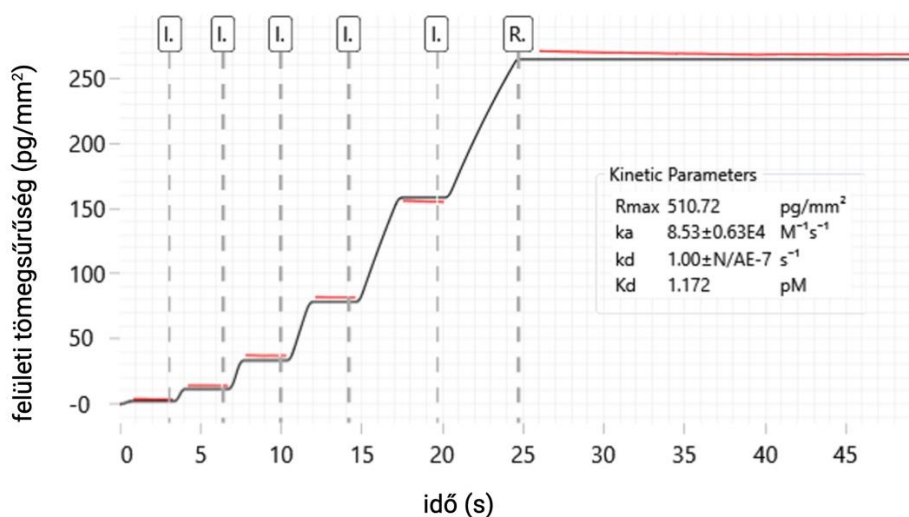


### 5.2.3 Eredmények és értékelésük

A WAVEcontrol program segítségével történő kiértékelés során különböző kinetikai paramétereket tudunk meghatározni, mindezt néhány kattintással.

Az első, FtsZ fehérjével és NCR247 peptiddel végzett mérések során., az 1  $\mu\text{M}$  peptid-koncentrációval végzett mérés esetében a  $K_D$  értéket 1,172 pM-nak kaptuk (5.24. ábra). A magas, 510,72  $\text{pg}/\text{mm}^2$ -es  $R_{\text{max}}$ -érték arról árulkodik, hogy az analit-ligand közötti kötés erőssége jóval, akár több nagyságrenddel is nagyobb előzetes várakozásainál, így nem az 'intermediate binders' modell által javasolt tartomány a legmegfelelőbb a molekulák közötti kötődés vizsgálatára, hanem sokkal inkább a tight binders opció.

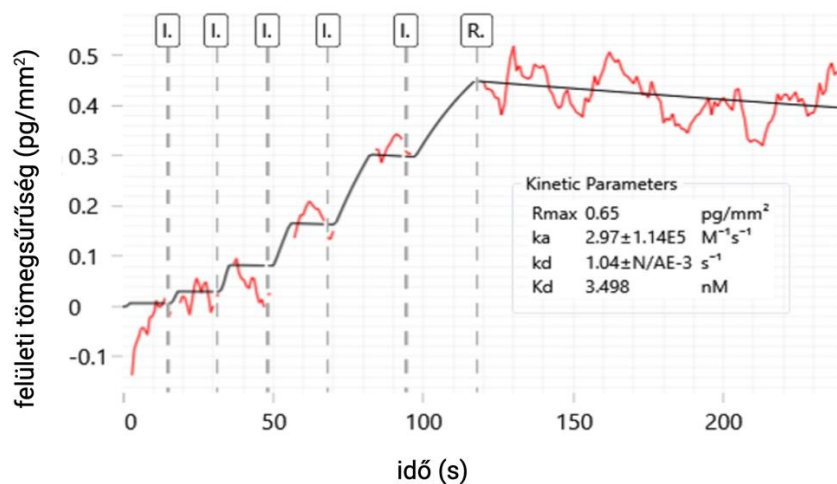
Az ajánlott, irodalmi  $R_{\text{max}}$ -érték 20-100  $\text{pg}/\text{m}^2$  felületi tömegsűrűsége tehető. [8]



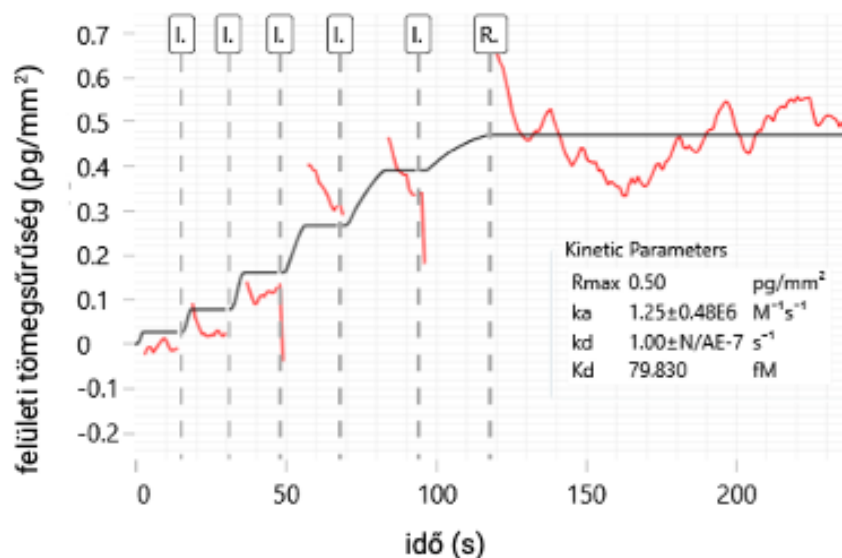
5.24. ábra: Az 1  $\mu\text{M}$ -os NCR247-koncentrációval végzett mérés kinetikai analízise, az FtsZ és az NCR247 kölcsönhatásának vizsgálata során.

A tight binder kontroll molekulaként alkalmazott acetazolamid esetében 100 nM-os -koncentrációval végzett mérés eredményéül 3,498 nM  $K_D$ -értéket kaptunk (5.25. ábra), míg az 50 nM-os mérés esetén ugyanez a paraméter 79,830 fM lett (5.26. ábra). Ezek a paraméter-eredmények a kontroll molekula irodalmi  $31 \pm 11$  nM-os  $K_D$ -értékétől eltérő eredményt mutatnak. [31]



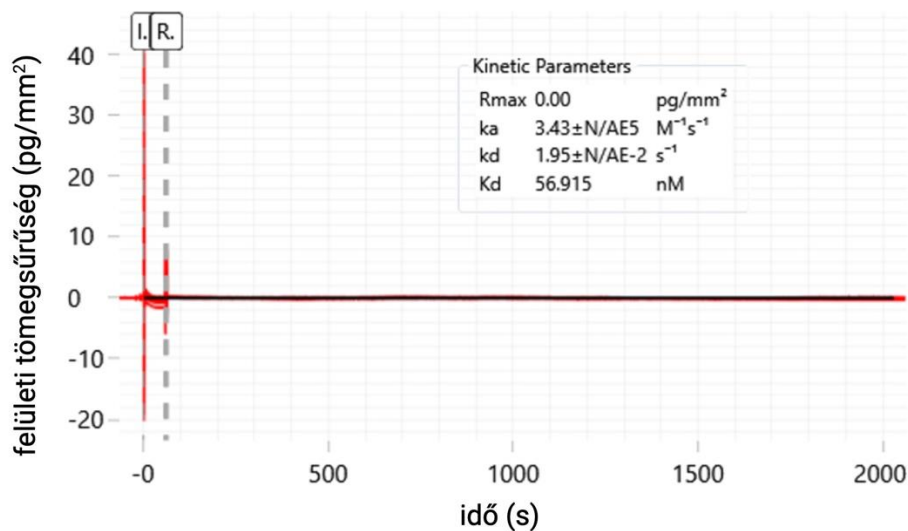


5.25. *ábra:* A 100 nM-os acetazolamid-koncentrációval végzett RAPID-mérés kinetikai analízise a CAII és acetazolamid kölcsönhatásának vizsgálata során.



5.26. *ábra:* Az 50 nM-os acetazolamid-koncentrációval végzett RAPID-mérés kinetikai analízise a CAII és acetazolamid kölcsönhatásának vizsgálata során.

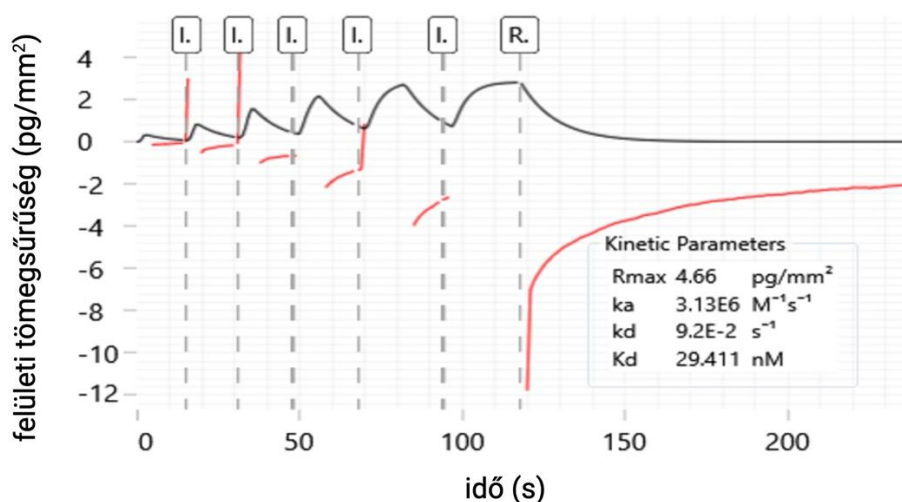
A hagyományos kinetikával, több koncentrációval végzett kísérlet során a  $K_D$ -érték 56,915 nM-nak adódott. Az  $R_{max}$ -érték 0-nak adódott az ajánlott 20-100 pg/mm<sup>2</sup>-es érték helyett. Mindez arra enged következtetni, hogy a mérés nem a legeredményesebb (5.27. ábra).



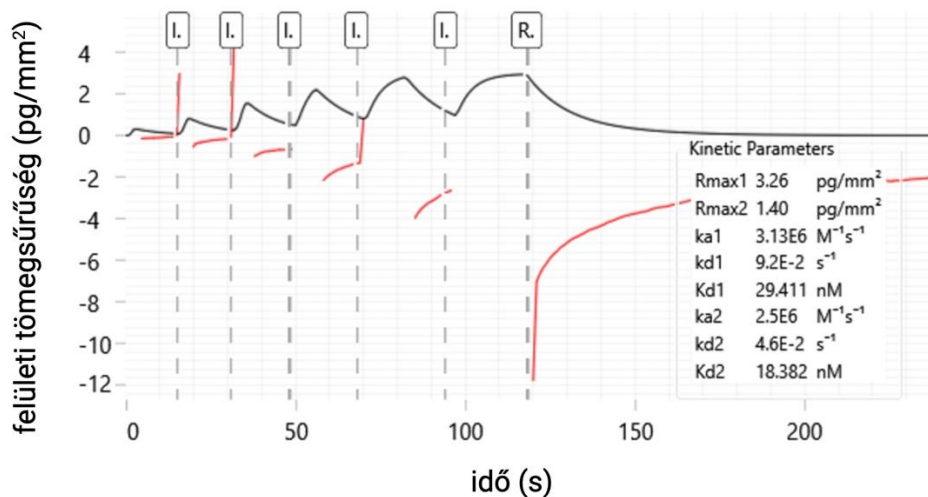
5.27. ábra: A hagyományos kinetikával végzett mérés kinetikai analízise a CAII és acetazolamid kölcsönhatásának vizsgálata során.

Ezt követően folytattuk az FtsZ fehérje és az NCR247 molekula közötti kölcsönhatás vizsgálatát. PCH-chippel és az újonnan készített reagensekkel is megismételtük a méréseket.

50 nM-os NCR247-koncentrációkkal végzett mérések során kétféle kinetikai modellt alkalmaztam az adatok kiértékelése során, melyre különböző, 29,411 nM (5.28. ábra), illetve 18,382 nM  $K_D$  (5.29. ábra) értékeket kaptam. Ezek az értékek reálisak, az irodalmi kontroll molekula  $K_D$ -értékéhez hasonló eredmények, viszont a program ebben az esetben sem tudott illesztést készíteni a mért eredmények alapján.



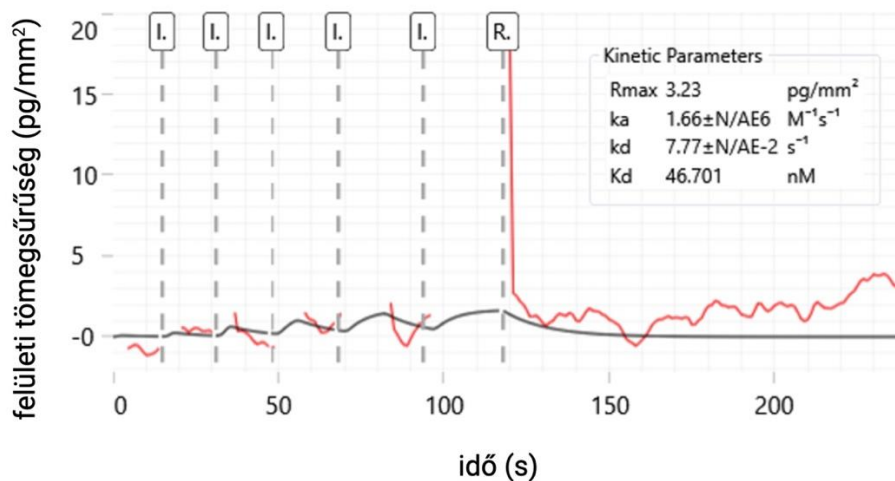
5.28. ábra: Az 50 nM-os NCR247-koncentrációval végzett RAPID mérés kinetikai analízise 1:1 kinetikai beállítással, az FtsZ és az NCR247 kölcsönhatásának vizsgálata során.



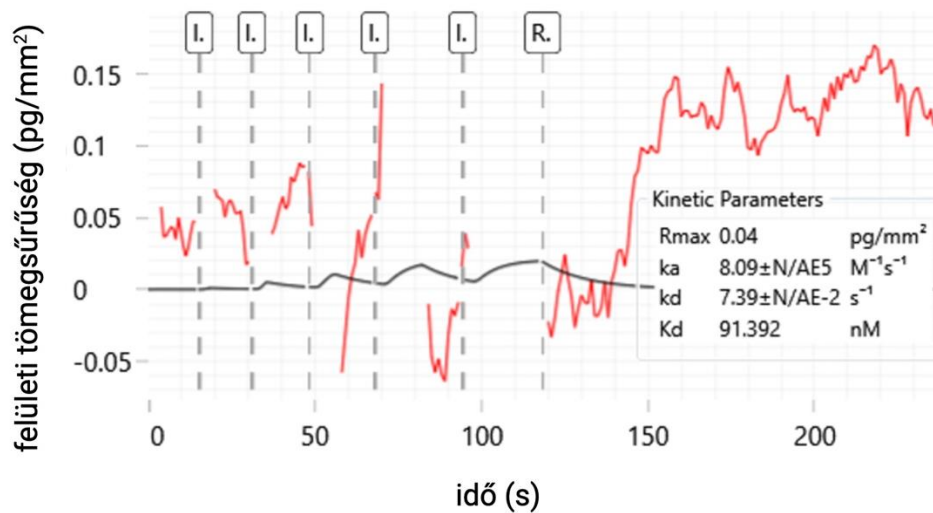
**5.29. ábra:** Az 50 nM-os NCR247-koncentrációval végzett RAPID mérés kinetikai analízise heterogén ligand beállítással, az FtsZ és az NCR247 kölcsönhatásának vizsgálata során.

Az újonnan készített EDC/NHS reagensekkel és újabb PCH-chippel is végeztünk mérést, hogy még több adatunk legyen a fehérje-peptid kölcsönhatásra vonatkozólag. Az NCR247 peptid-oldat 50 nM-os és 100 nM-os koncentrációt alkalmaztunk a mérés során.

A mérés eredményeül 46,701 nM (5.30. ábra), valamint 91,392 nM (5.31. ábra) egyensúlyi disszociációs konstans értékeket mértünk, melyek közül az R<sub>max</sub>-értékeket is figyelembe véve, a 46,701 nM a realisabb, irodalmi értékhez közeli.



**5.30. ábra:** Az 50 nM-os NCR247-koncentrációval végzett RAPID-mérés kinetikai analízise, az FtsZ és az NCR247 kölcsönhatásának vizsgálata során.



**5.31. ábra:** A 100 nM-os NCR247-koncentrációval végzett RAPID-mérés kinetikai analízise, az FtsZ és az NCR247 kölcsönhatásának vizsgálata során.

Összességében elmondható, hogy a különféle NCR247 peptid-koncentrációkkal végzett mérések tekintetében további kísérletezés szükséges a kialakuló molekuláris kölcsönhatás még pontosabb kinetikai paramétereinek feltérképezése érdekében. A rendelkezésre álló további NCR-peptidekkel is szeretnék kísérleteket végezni, hogy az FtsZ fehérjéhez való kötődésükről minél részletesebb kinetikai információkat nyerjék.

## 6. Összefoglalás

Munkám során különböző biofizikai kísérleteket végeztem, melyek keretében fetuin, CAII, valamint FtsZ ligandumok és kismolekulás hatóanyagok között kialakuló molekuláris kinetikai kölcsönhatásokat figyeltem meg, GCI jelölésmentes optikai bioszenzorral. Mindezt többféle: hagyományos-, illetve RAPID kinetikai módban és a mérőrendszerhez tartozó WAVEcontrol programban valós időben nyomon követve.

A deszorpciót, új PCP- vagy PCH-chip behelyezését, illetve kondicionálási műveleteket követően, a mérések immobilizációs szériájában az aminkapcsolás nevezetű kovalens kötéskémiával kötöttem ki a WAVEchip 1-es, 2-es, illetve 3-as mérőcsatornájának felületére a ligandumokat. A 4-es csatorna referenciacsatorna szerepet töltött be a mérések során.

A fetuin esetében  $8935 \text{ pg/mm}^2$ , a karbon-anhidráz esetében  $761 \text{ pg/mm}^2$ , míg az FtsZ esetében  $4531 \text{ pg/mm}^2$  maximális felületi tömegsűrűség-mennyiséget sikerült kikötni.

Ezután a kinetikai szériában történt meg az analitok: a PNGáz F enzim-, az NCR247-, illetve az acetazolamid-oldatok injektálása a chip csatornáira, ezáltal az analit-ligand molekuláris kölcsönhatások létrehozása.

A kiértékelés során megállapítottam, hogy a fetuin glikoprotein enzimátikus hasítása során a mérőcsatornákon  $-31,4 \text{ pg/mm}^2$ ,  $-19,3 \text{ pg/mm}^2$  és  $-6,8 \text{ pg/mm}^2$  értékre csökkentek a fetuin cukoregységeinek tömegsűrűség-értékei az 1. ciklust követően, majd a felületi borítottság ciklusról-ciklusra egyre csökkenő tendenciát mutatott.

Emellett különféle, az FtsZ fehérje és NCR247 peptid, valamint a CAII és az tight binders kontroll acetazolamid-vegyület molekuláris kölcsönhatását leíró, kinetikai paramétereket tudtam meghatározni. A legjobb eredményeket a PCH-chipen, a frissen készített EDC/NHS-reagensekkel végzett immobilizáció után, az  $50 \text{ nM}$ -os NCR247-koncentrációval, RAPID-kinetikával végzett mérés során kaptam, mégpedig  $29,411 \text{ nM}$   $K_D$ -értéket, ami az irodalmi értékhez hasonló.

Mindezek alapján kijelenthető, hogy GCI technika kinetikai paraméterek, kötőhely affinitási állandók meghatározása mellett alkalmas enzimes hasítás valós-idejű megfigyelésére is.

További céljaim között szerepel a fehérje és a peptid közötti további, illetve a peptidcsalád többi képviselője között kialakuló kölcsönhatások vizsgálata is. Céлом még a chipfelületen kikötött FtsZ fehérje felületi tömegsűrűségének növelésére az aminkapcsolás

helyett más típusú kovalens kötés alkalmazása is, vagy a fehérje His-tag segítségével történő rögzítése a chipfelületre.

## 7. Köszönetnyilvánítás

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

Hálás szívvel köszönöm Dr. Kurunczi Sándornak a kísérletek megtervezésében, illetve kivitelezésében nyújtott nagylelkű, odafigyelő és magasfokú szakmai segítségét, mellyel végigkísérte a kutatómunkát.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Vonderviszt Ferencnek, Dr. Járvás Gábornak és Dr. Guttman Andrásnak, akik a munkám során felhasznált fetuin fehérjét, PNGáz F enzimet és szakmai segítséget is szolgáltattak.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Kondorosi Évának és Dr. Endre Gabriellának, hogy az FtsZ fehérje és a NCR peptidek mellett szakmai segítséget is biztosítottak.

Hálás köszönet illeti Majoros Barbarát és Magyaródi Beatrixot, akikhez bármilyen felmerülő kérdésemmel fordulhattam, és jószívvel álltak rendelkezésemre. Köszönöm a Nanobioszenzorika Laboratórium minden egyes tagjának kutatómunkám során nyújtott segítségét.

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

## Irodalomjegyzék

- [1] Damborský, P., Švitel, J., & Katrlík, J. (2016). Optical biosensors. *Essays in biochemistry*, 60(1), 91–100. <https://doi.org/10.1042/EBC20150010>
- [2] Naresh, V., & Lee, N. (2021). A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 21(4), 1109. <https://doi.org/10.3390/s21041109>
- [3] Jankovics, H., Kovacs, B., Saftics, A., Gerecsei, T., Tóth, É., Szekacs, I., Vonderviszt, F., & Horvath, R. (2020). Grating-coupled interferometry reveals binding kinetics and affinities of Ni ions to genetically engineered protein layers. *Scientific reports*, 10(1), 22253. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79226-w>
- [4] Peter Kozma, András Hámori, Sándor Kurunczi, Kaspar Cottier, Robert Horvath. (2011). Grating coupled optical waveguide interferometer for label-free biosensing., *Sensors & Actuators: B. Chemical* 155 (2). pp. 446-450., 0925-4005, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.12.045>
- [5] Patko, D., Cottier, K., Hamori, A., & Horvath, R. (2012). Single beam grating coupled interferometry: high resolution miniaturized label-free sensor for plate based parallel screening. *Optics express*, 20(21), 23162–23173. <https://doi.org/10.1364/OE.20.023162>
- [6] Chen, C., & Wang, J. (2020). Optical biosensors: an exhaustive and comprehensive review. *The Analyst*, 145(5), 1605–1628. <https://doi.org/10.1039/c9an01998g>
- [7] Péter, B., Majoros, B., Kurunczi, S., Ács, A. V., Szekacs, I., Bősze, S., Kovács, G. M., Boldizsár, I., & Horvath, R. (2023). Label-free biosensing of lignans for therapeutics using engineered model surfaces. *International journal of biological macromolecules*, 233, 123528. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123528>
- [8] Creoptix-WAVEsystem guide (2022).
- [9] Kartal, Ö., Andres, F., Lai, M. P., Nehme, R., & Cottier, K. (2021). waveRAPID-A Robust Assay for High-Throughput Kinetic Screens with the Creoptix WAVEsystem. *SLAS discovery: advancing life sciences R & D*, 26(8), 995–1003. <https://doi.org/10.1177/24725552211013827>
- [10] Ramazi, S., & Zahiri, J. (2021). Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database: the journal of biological databases and curation*, 2021, baab012. <https://doi.org/10.1093/database/baab012>



- [11] Harvey D. J. (2005). Proteomic analysis of glycosylation: structural determination of N- and O-linked glycans by mass spectrometry. *Expert review of proteomics*, 2(1), 87–101. <https://doi.org/10.1586/14789450.2.1.87>
- [12] Brockhausen, I., Schutzbach, J., & Kuhns, W. (1998). Glycoproteins and their relationship to human disease. *Acta anatomica*, 161(1-4), 36–78. <https://doi.org/10.1159/000046450>
- [13] Sarkadi, L. (2007). *Biokémia mérnök szemmel*. Typotex kiadó.
- [14] Li, Y., Tran, A. H., Danishefsky, S. J., & Tan, Z. (2019). Chemical biology of glycoproteins: From chemical synthesis to biological impact. *Methods in enzymology*, 621, 213–229. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.02.030>
- [15] Chekol Abebe, E., Tilahun Muche, Z., Behaile T/Mariam, A., Mengie Ayele, T., Mekonnen Agidew, M., Teshome Azezew, M., Abebe Zewde, E., Asmamaw Dejenie, T., & Asmamaw Mengstie, M. (2022). The structure, biosynthesis, and biological roles of fetuin-A: A review. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 945287. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.945287>
- [16] Dabrowska, A. M., Tarach, J. S., Wojtysiak-Duma, B., & Duma, D. (2015). Fetuin-A (AHSG) and its usefulness in clinical practice. Review of the literature. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 159(3), 352–359. <https://doi.org/10.5507/bp.2015.018>
- [17] Lin, Y. H., Franc, V., & Heck, A. (2018). Similar Albeit Not the Same: In-Depth Analysis of Proteoforms of Human Serum, Bovine Serum, and Recombinant Human Fetuin. *Journal of proteome research*, 17(8), 2861–2869. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00318>
- [18] Karav S., Casaburi G., Arslan A, Kaplan M., Sucu B., Frese F. (2019). N-glycans from human milk glycoproteins are selectively released by an infant gut symbiont in vivo. *Journal of Functional Foods*, Volume 61, 1756-4646. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103485>.
- [19] Borsodi, A., Felföldi, T., Jáger, K., Makk, J., Márialigeti, K., Romsics, Cs., Tóth, E., Bánfi, R., Pohner Zs., Vajna, B. (2013) *Bevezetés a prokarióták világába*. Eötvös Loránd Tudományegyetem.
- [20] Wang, M., Fang, C., Ma, B. et al. Regulation of cytokinesis: FtsZ and its accessory proteins. *Curr Genet* 66, 43–49 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01005-6>

- [21] Barrows, J. M., & Goley, E. D. (2021). FtsZ dynamics in bacterial division: What, how, and why? *Current opinion in cell biology*, 68, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.10.013>
- [22] Bratek, Z., Fodor, F., Király, I., Nyitrai, P., Rácz, I., Rudnóy, Sz., Sárvári, É., Solti, Á., Szigeti, Z., Tamás, L. (2013). A növényi anyagcsere élettana. Eötvös Loránd Tudományegyetem.
- [23] Farkas, A., Maróti, G., Durgó, H., Györgypál, Z., Lima, R. M., Medzihradzky, K. F., Kereszt, A., Mergaert, P., & Kondorosi, É. (2014). *Medicago truncatula* symbiotic peptide NCR247 contributes to bacteroid differentiation through multiple mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14), 5183–5188. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404169111>
- [24] Lima, R. M., Rathod, B. B., Tiricz, H., Howan, D. H. O., Al Bouni, M. A., Jenei, S., Tímár, E., Endre, G., Tóth, G. K., & Kondorosi, É. (2022). Legume Plant Peptides as Sources of Novel Antimicrobial Molecules Against Human Pathogens. *Frontiers in molecular biosciences*, 9, 870460. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.870460>
- [25] Catalano, C. M., Lane, W. S., & Sherrier, D. J. (2004). Biochemical characterization of symbiosome membrane proteins from *Medicago truncatula* root nodules. *Electrophoresis*, 25(3), 519–531. <https://doi.org/10.1002/elps.200305711>
- [26] Clarke, V. C., Loughlin, P. C., Day, D. A., & Smith, P. M. (2014). Transport processes of the legume symbiosome membrane. *Frontiers in plant science*, 5, 699. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00699>
- [27] Oono, R., & Denison, R. F. (2010). Comparing symbiotic efficiency between swollen versus nonswollen rhizobial bacteroids. *Plant physiology*, 154(3), 1541–1548. <https://doi.org/10.1104/pp.110.163436>
- [28] Yi, Q. M., & Lutkenhaus, J. (1985). The nucleotide sequence of the essential cell-division gene *ftsZ* of *Escherichia coli*. *Gene*, 36(3), 241–247. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90179-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90179-9)
- [29] Lindskog, S. (1997). „Structure and mechanism of carbonic anhydrase. „*Pharmacology & Therapeutics*, 74(1), 1-20.
- [30] Warrillow, S. (2009). "Carbonic Anhydrase Inhibitors." In: Ronco, C., Bellomo, R., & Kellum, J.A. *Critical Care Nephrology*, 566-568.

[31] Papalia, G. A., Leavitt, S., Bynum, M. A., Katsamba, P. S., Wilton, R., Qiu, H., Steukers, M., Wang, S., Bindu, L., Phogat, S., Giannetti, A. M., Ryan, T. E., Pudlak, V. A., Matusiewicz, K., Michelson, K. M., Nowakowski, A., Pham-Baginski, A., Brooks, J., Tieman, B. C., Bruce, B. D., ... Myszka, D. G. (2006). Comparative analysis of 10 small molecules binding to carbonic anhydrase II by different investigators using Biacore technology. *Analytical biochemistry*, 359(1), 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.08.021>

[32] Aslam, S., & Gupta, V. (2023). Carbonic Anhydrase Inhibitors. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

## Internetes hivatkozások

[i1] <https://www.technologynetworks.com/proteomics/articles/an-introduction-to-post-translational-modifications-343603>

[i2] <https://biologydictionary.net/glycoprotein/>

[i3] <https://international.neb.com/products/p0704-pngase-f#Product%20Information>

[i4] <https://www.takarabio.com/products/protein-research/glycobiology/glycopeptidase-f>

[i5] <https://byjus.com/question-answer/carbonic-anhydrase-is-found/>

[i6] [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011309\\_NHS\\_SulfoNHS\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011309_NHS_SulfoNHS_UG.pdf)

[i7] [http://myweb.sabanciuniv.edu/javed/files/2009/10/JHNiazi\\_Week-11.pdf](http://myweb.sabanciuniv.edu/javed/files/2009/10/JHNiazi_Week-11.pdf)