

Bevezetés

A „Mikroelektroforetikus eszközök fejlesztése bioanalitikai alkalmazásokhoz” című NN127062 azonosító számú projekt célja nagy felbontású hidrofil kölcsönhatás elektrokromatográfiás (HICEC) elválasztási módszerek kifejlesztése és különböző célú bioanalitikai alkalmazása volt. A kutatási tervnek megfelelően új, nagy felbontású hidrofil kölcsönhatás elektrokromatográfiás (HICEC) módszerek és mintaelőkészítési eljárások kerültek kifejlesztésre. A projekt megvalósítása során megtörtént a HICEC technológia integrálása a nagyfelbontású kapilláris elektroforézis elválasztások folyamatába offline és online módon egyaránt. Az elvégzett munka során három, különböző típusú HICEC eljárást dolgoztunk ki és vizsgáltunk meg: A) polimer pszeudo állófázis (HICEC-PSP); B) porózus réteggel bevont kapilláris (HICEC-PLOT), és C) monolit állófázissal kitöltött kapilláris (HICEC-MONO). A HICEC technológia fejlesztésénél fontos szempont volt az új módszerek integrálhatóságának biztosítása a pályázat többi partnere által kifejlesztett mikroelektroforetikus bioanalitikai platformba, kezdve a biológiai minták mintaelőkészítéstől (koreai, szlovák és lengyel kutatócsoportok) az ultranagy érzékeny detektálásig (cseh kutatócsoport). Az elvégzett szakmai munka tartalmi szempontból a benyújtott és elfogadott kutatási terv szerint került megvalósításra, ugyanakkor a COVID19 járvány csúszásokat okozott az ütemtervben, melyeket szerződésmódosítással kezelni tudtunk.

Polimer pszeudo állófázisok

A nem-ionos polimer pszeudo állófázisok (PSP) az elektrokromatográfiás elválasztások egyik legígéretesebb képviselője. PSP esetén a nem-ionos hidrofil polimer az elválasztó pufferben kerül feloldásra. A leggyakrabban alkalmazott polimerek a polietilén oxid, a polivinil alkohol, a lineáris poliakrilamid és ezek különböző arányú keveréke. A projekt során megvizsgáltuk különböző lánchosszúságú (300.000 – 1.000.000 egység) és koncentrációjú (0,4% - 3%) polimer oldatok és viszkozitás növelő adalékanyagok elválasztásra gyakorolt hatását.

Komplex cukrok hidrofil interakciós elektrokromatográfiás folyamatának megértése érdekében különböző hőmérsékleteken vizsgáltuk az aktiválási energia hatását szénhidrátok elektromigrációjára az Arrhenius összefüggés alapján. Ennek érdekében sorozatméréseket végeztünk 20, 30, 40 és 50 °C-on, különböző mennyiségű polietilén-oxidot (PEO) tartalmazó PSP rendszerekben. Az elválasztás során fontos szerepet játszó különböző mechanizmusok megkülönböztethetőségének érdekében a polimer adalékon kívül megvizsgáltuk az etilén glikol, mint viszkozitás növelő adalék hatását illetve a mérést elvégeztük növekvő koncentrációjú szerves komponenst (acetonitril) tartalmazó háttér elektrolitban is. Teszt molekulaként lineáris cukorstruktúrák homológ sorát (α 1-4 kötésű glükóz oligomerek) valamint humán immunoglobulin glikoproteinről enzimesen lehasított elágazó láncú oligoszaharidok elegyét alkalmaztuk.

A sorozatmérések során meghatározott mobilitás értékek logaritmusát a hőmérséklet reciprokaként ábrázolva az ún. Arrhenius diagrammokat kapjuk. Az Arrhenius diagram egyenesének meredekségéből az aktiválási energia közvetlenül számolható. Szénhidrátok elektromigrációja során az aktiválási energiát úgy lehet értelmezni, mint ami a súrlódási erő valamint a cukormolekula és az elválasztó közeg között fellépő intermolekuláris kölcsönhatások leküzdéséhez szükséges energia összege. A kísérleti adatok kiértékelése során az adalékok

koncentrációjától függően aktiválási energia változást tapasztaltunk lineáris maltooligoszaharidok esetén, mely a molekuláris konformáció változásokhoz volt köthető. A mobilitás értékek logaritmusát a háttéreltrolit PEO tartalmának függvényében ábrázolva az ún. Ferguson ábrát kapjuk, melyből a retardációs koeficiensek közvetlenül számíthatóak. Méréseink alapján megállapítottuk a számított retardációs koeficiensről, hogy a viszkozításra jellemző komponens és a szénhidrát minta adalék polimerrel való kölcsönhatására jellemző komponens összegének tekinthető.

Az így kifejlesztett PSP elektrokromatográfiai módszert sikeresen alkalmaztuk alacsony energiájú protonnyalábbal besugárzott humán immunoglobulinok N-glikozilációs profiljának meghatározására, abból a célból, hogy hosszas űrutazás során (Pl. Mars utazás) a galaktikus kozmikus sugárzás és naptevékenység hatásra esetlegesen kialakuló betegségeket idejekorán lehessen diagnosztizálni. Besugárzásra Van de Graaff generátort és Tandetron gyorsítót alkalmaztunk. A növekvő besugárzás hatása jól megfigyelhető Tandetronból származó 36000, 54000 és 180000 Gy dózisu protonnyalábbal kezelt humán immunoglobulinok és kezeletlen kontrol minta összehasonlításnak esetében.

Porózus réteggel bevont kapillárisok

A HICEC-PLOT esetében, az oszlopok belső falán funkcionálizálható, viszonylag vastag porózus hordozóréteg van, amely minden esetben egy nagyon kis átmérőjű szabadon átjárható térrészt biztosít koaxiálisan az oszlop tengelyében. A polimer alapú monolit állófázisok rendelkeznek a polimerek előnyös tulajdonságaikkal, azaz nagy pH stabilitást és kiemelkedő mechanikai szilárdságot mutatnak. A porózus polimerekben a diffúziós anyagátadás másodlagos jelentőségű, így a konvektív anyagátadás a jellemző transzportmechanizmus, mely kiemelt szereppel bír elektrokromatográfiai elválasztások során, ahol az elektroosmotikus áramlás miatt dugószerű áramlási profillal rendelkező kényszeráramlás biztosítja a komponens transzportot.

A projekt során kidolgozott új, nagyfelbontású HICEC-PLOT elektrokromatográfiai elválasztási módszer lehetőséget biztosít a fluorofór jelölt glikánok eddigénél nagyobb felbontású kvalitatív és kvantitatív analízisére. Míg a lézer indukált fluoreszcens detektálású kapilláris elektroforézis (LIF-CE) esetében minden egyes glikán ugyan olyan érzékenységgel detektálható (hiszen mindegyik eltérő cukor molekulát ugyan olyan módon és csak egy pozícióban jelölünk) addig a kapilláris elektroforézis tömegspektrométeres detektálása (CE-MS) esetében a különböző cukrok eltérő módon ionizálódhatnak. A CE-MS mennyiségi meghatározás során fellépő ún. rendszeres hiba kiküszöbölésének érdekében kifejlesztettünk egy olyan új módszert, ahol a CE-MS interfész Taylor-kúp részében a tömegspektrometriás meghatározással (kvalitatív) párhuzamosan lehetőség van LIF jel (kvantitatív) detektálásra is. A Taylor-kúp a folyadék fázisú elválasztás legutolsó szegmense, azaz az a pont, ami éppen kilép a kapillárisból. Ez a pont térben és időben optimális lehetőséget biztosít az optikai jel detektálására. Az optikai és tömegspektrometriás jelek összevetéséből minden eddigieknél pontosabb, szimultán kvalitatív és kvantitatív analízis válik lehetővé, hiszen a jelek egyazon elválasztásból származnak így nem lép fel a reprodukálásból származó migrációs időben tapasztalható eltérés.

Monolit állófázisok

A HICEC-MONO esetében *in situ* polimerizációt alkalmaztunk porózus monolit oszloptöltet kialakítására, amely a kapilláris teljes belső átmérőjét kitölti. A kapilláris belső falán található szilanol csoportok (Si-OH) szilanizáló szerrel történő kezelése különösen fontos a monolit rögzítéséhez. A porogén rendszer megfelelő megválasztása megkönnyítette az optimális pórusszerkezetű és megfelelő anyagátadású HICEC-MONO oszlopok kialakítását. A HICEC szeparációs eszközök fejlesztése jelentős szerepet játszott a projekt megvalósításában, mivel a monolit állófázisok nem csak offline hanem online módon is integrálhatóak az elválasztási rendszerbe, így minta pre-koncentráls feladatokat is el tudtak látni.

A HICEC-MONO kapillárisokat *in situ* polimerizációval állítottuk elő az alábbi eljárás segítségével: első lépésként UV transzparens szilícium-dioxid kapilláris belső felületét előkezeltek. Ehhez 1 M NaOH, 0,1 M HCl és vizes mosásokat alkalmaztunk, ezután acetonnal eltávolítottuk a maradék vizet a kapilláris belsejéből és nitrogéngáz átfúvatással 120°C-on kiszárítottuk. Ezt követően Metakril-oxi-propil-trimetoxi-szilán (MAPS) segítségével funkcionizáltuk a kapilláris belső falát. Ehhez a MAPS 50%-os acetonos oldatával feltöltöttük a kapillárist, szilikon szeptum dugóval lezártuk a kapilláris mindkét végét, majd 100°C-on inkubáltuk 2 óra keresztül. A reakció lejátszódása után metanol-víz 1:1 arányú keverékével és metanollal mostuk a kapillárist majd nitrogéngázzal újra kiszárítottuk.

Az így kapott funkcionizált kapillárisban már kialakítható volt a monolit állófázis. Ehhez Etilénglikol-metakrilát-foszfát (EGMP) monomert használtunk, amihez Akrilamid - Bisztrakrilamid (19:1) keveréket adtunk. Gyökös iniciátornak 2,2-azobiszizobutílnitrilt (AIBN), a pórusméret beállításához Dodekanolt, oldószernek pedig Dimetil-szulfoxid-ot (DMSO) és Dimetilformamid-ot (DMF) használtunk. Az így kapott reakcióelegyet keverés után 20 percig ultrahanggal szonikáltuk, majd nitrogén gázt buborékolattunk át rajta, hogy a reakciókomponensek hiánytalanul feloldódjanak és eltávolítsák a levegő oldott oxigénjét az oldatból. A MAPS kezeléshez hasonlóan feltöltöttük a kapillárist a reakcióeleggyel, a végeit lezártuk és a monolit kívánt 0,5-2 cm-es pozícióján kívül mindenhol lefedtük a kapillárist fekete ragasztószalaggal, végül pedig UV kemencében 15 perc alatt lejátszattuk a polimerizációs reakciót. Végül az elkészült monolitot metanollal mostuk. A kész monolit foszfát funkciós csoportjaihoz cirkónium ionokat rögzítve kaptunk funkcionizált IMAC-Zr monolitot (angol terminológia szerint rövidítve: „immobilized metal affinity chromatography”). Ehhez a kapillárist feltöltöttük $ZrOCl_2$ oldattal és a végeit lezárva tartva egy éjszakán át, szobahőmérsékleten lejátszódott a reakció. Az így kapott Zr módosított monolitból vizes mosással távolítottuk el a nem reagált reakció komponenseket.

Monolit állófázis alkalmazása offline és online prekoncentrálsnál

A Zr módosított IMAC monolitok képesek ionos és koordinációs kötések segítségével megkötni a szulfát csoportokat, így alkalmasak APTS jelölt cukrok immobilizálására és prekoncentrálsára, mely a beszámolási időszak legfontosabb alkalmazástechnikai feladata volt. Amennyiben átáramoltatunk egy, a kapilláris térfogatához képest relatíve nagy térfogatú, de kiskoncentrációjú APTS jelölt komplex cukor mintát az így kialakított monolit oszlopon, majd eluáljuk a kikötött mintát a kiindulásnál kisebb térfogatban, a minta nagyfokú dúsulását érzük el. A minta (~100-200 μ l) felkötéséhez savas körülmények szükségesek, ezért 0,5% hangyasavat adtunk a mintához. A

felkötési lépés közben a kapilláris elektroforézis berendezés lézer indukált fluoreszcens (LIF) detektorával ellenőriztük, hogy a monolit valóban megkötötte a jelölt cukrokat. A felkötést követően 0,5% vizes hangyasav oldattal mostuk az oszlopot. Az összeállított rendszert megbontva fluoreszcens mikroszkóppal is ellenőriztük, hogy a minta valóban kikötött-e a monolit állófázisra. Az eluáláshoz bázikus kémhatás szükséges, amihez 3 M NH₄OH oldatot használtunk. Az LIF detektor megfelelően regisztrálta, hogy a betöményített minta, keskeny zónában (~1 perc) és kis térfogatban (~1 ul) eluálódott.

Nemzetközi együttműködés

A fent röviden bemutatott eredményeinket a projekt megvalósítás három és fél éve során folyamatosan megosztottuk a nemzetközi konzorcium tagjaival (Korea, Csehország, Szlovákia és Lengyelország), akik integrálták illetve saját rendszereikhez adaptálták az új kapilláris elektrokratográfiás eljárásokat az általuk fejlesztett online mintaelőkészítési és prekoncentrációs technikákhoz, többek között az csepp-mikroextrakcióhoz (SDME), in-tube mikroextrakcióhoz (ITME) valamint a folyadék-extrakciós felület analízishez (LESA). Az így kialakított kapcsolt eljárások jelentősen hozzájárulnak a nagyhatékonyságú és nagy felbontóképességű új bioanalitikai módszerek elterjedéséhez mind ipari mind akadémiai környezetben.

Megjelent tudományos közlemények jegyzéke, melyek a támogatóra való hivatkozást a megfelelő előírások szerint tartalmazzák

1. Szarka, M., S. Szilasi, B. Donczo, D. Sarkozy, I. Rajta, and A. Guttman, The effect of simulated space radiation on the N-glycosylation of human immunoglobulin G1. *Electrophoresis*, 2018. 39(22): p. 2872-2876.
2. Járvás, G. and A. Guttman, Commentary regarding “Decision support algorithm for the selection of analytical methods in organic compounds detection for future extraterrestrial exploratory missions”. *Electrophoresis*, 2019. 40(20): p. 2662-2663.
3. Szarka, M., M. Szigeti, and A. Guttman, Imaging Laser-Induced Fluorescence Detection at the Taylor Cone of Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2019. 91(12): p. 7738-7743.
4. Borza, B., L. Hajba, and A. Guttman, N-glycan Analysis in Molecular Medicine: Innovator and Biosimilar Protein Therapeutics. *Current Molecular Medicine*, 2020. 20(10): p. 828-839.
5. Drouin, N., M. van Mever, W. Zhang, E. Tobolkina, S. Ferre, A.C. Servais, M.J. Gou, L. Nyssen, M. Fillet, G.S.M. Lageveen-Kammeijer, J. Nouta, A.J. Chetwynd, I. Lynch, J.A. Thorn, J. Meixner, C. Lossner, M. Taverna, S. Liu, N.T. Tran, Y. Francois, A. Lechner, R. Nehm, G.A.D. Banni, R. Nasreddine, C. Colas, H.H. Lindner, K. Faserl, C. Neususs, M. Nelke, S. Lammerer, C. Perrin, C. Bich-Muracciole, C. Barbas, A.L. Gonzalez, A. Guttman, M. Szigeti, P. Britz-McKibbin, Z. Kroezen, M. Shanmuganathan, P. Nemes, E.P. Portero, T. Hankemeier, S. Codesido, V. Gonzalez-Ruiz, S. Rudaz, and R. Ramautar, Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry at

Trial by Metabo-Ring: Effective Electrophoretic Mobility for Reproducible and Robust Compound Annotation. *Analytical Chemistry*, 2020. 92(20): p. 14103-14112.

6. Farkas, A., B. Meszaros, M. Szarka, M. Szigeti, J. Kappelmayer, M. Szabo, E. Csanky, and A. Guttman, Modeling of the Desialylated Human Serum N-glycome for Molecular Diagnostic Applications in Inflammatory and Malignant Lung Diseases. *Curr Mol Med*, 2020. 20(10): p. 765-772.

7. Filep, C., B. Borza, G. Jarvas, and A. Guttman, N-glycosylation analysis of biopharmaceuticals by multicapillary gel electrophoresis: Generation and application of a new glucose unit database. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020. 178.

8. Filep, C. and A. Guttman, The Effect of Temperature in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis of Protein Therapeutics. *Analytical Chemistry*, 2020. 92(5): p. 4023-4028.

9. Fonslow, B., G. Jarvas, M. Szigeti, and A. Guttman, Multilevel Characterization of Antibody-Ligand Conjugates by CESI-MS. *Current Molecular Medicine*, 2020. 20(10): p. 789-797.

10. Gebri, E., Z. Kovacs, B. Meszaros, F. Toth, A. Simon, H. Jankovics, F. Vonderviszt, A. Kiss, A. Guttman, and T. Hortobagyi, N-Glycosylation Alteration of Serum and Salivary Immunoglobulin A Is a Possible Biomarker in Oral Mucositis. *Journal of Clinical Medicine*, 2020. 9(6).

11. Hajba, L. and A. Guttman, Recent Advances in Capillary Electrochromatography of Proteins and Carbohydrates in the Biopharmaceutical and Biomedical Field. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2020.

12. Hajba, L. and A. Guttman, Recent Advances in the Analysis Full/Empty Capsid Ratio and Genome Integrity of Adeno-associated Virus (AAV) Gene Delivery Vectors. *Current Molecular Medicine*, 2020. 20(10): p. 806-813.

13. Hurjak, B., Z. Kovacs, B. Donczo, E. Katona, G. Haramura, F. Erdelyi, A. Housang Shemirani, F. Sadeghi, L. Muszbek, and A. Guttman, N-glycosylation of blood coagulation factor XIII subunit B and its functional consequence. *J Thromb Haemost*, 2020. 18(6): p. 1302-1309.

14. Jarvas, G., A. Guttman, N. Miekus, T. Baczek, S. Jeong, D.S. Chung, V. Patoprsty, M. Masar, M. Hutta, V. Datinska, and F. Foret, Practical sample pretreatment techniques coupled with capillary electrophoresis for real samples in complex matrices. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2020. 122.

15. Jarvas, G., M. Szigeti, M.P. Campbell, and A. Guttman, Expanding the capillary electrophoresis-based glucose unit database of the GUcal app. *Glycobiology*, 2020. 30(6): p. 362-364.

16. Komaromy, A., B. Reider, G. Jarvas, and A. Guttman, Glycoprotein biomarkers and analysis in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer with special focus on serum immunoglobulin G. *Clinica Chimica Acta*, 2020. 506: p. 204-213.

17. Meszaros, B., G. Jarvas, A. Farkas, M. Szigeti, Z. Kovacs, R. Kun, M. Szabo, E. Csanky, and A. Guttman, Comparative analysis of the human serum N-glycome in lung cancer, COPD and their comorbidity using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2020. 1137.
18. Meszaros, B., Z. Kovacs, E. Gebri, H. Jankovics, F. Vonderviszt, A. Kiss, A. Simon, S. Botka, T. Hortobagyi, and A. Guttman, N-glycomic Analysis of Z(IgA1) Partitioned Serum and Salivary Immunoglobulin A by Capillary Electrophoresis. *Current Molecular Medicine*, 2020. 20(10): p. 781-788.
19. Szabo, M., L. Hajba, R. Kun, A. Guttman, and E. Csanky, Proteomic and Glycomic Markers to Differentiate Lung Adenocarcinoma from COPD. *Curr Med Chem*, 2020. 27(20): p. 3302-3313.
20. Szabo, M., R. Kun, L. Hajba, R. Koncz, A. Guttman, and E. Csanky, The potential role of proteomic and glycomic biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease diagnostics. *Orvosi Hetilap*, 2020. 161(4): p. 123-128.
21. Szekrenyes, A., M. Szigeti, V. Dvorakova, G. Jarvas, and A. Guttman, Quantitative comparison of the N-glycosylation of therapeutic glycoproteins using the Glycosimilarity Index. A tutorial. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2020. 122.
22. Filep, C. and A. Guttman, Effect of the Monomer Cross-Linker Ratio on the Separation Selectivity of Monoclonal Antibody Subunits in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 2021. 93(7): p. 3535-3541.
23. Matyas, B., J. Singer, M. Szarka, D.A. Lowy, B. Donczo, P. Makleit, V.E. Failoc-Rojas, A. Ramirez, P. Martinez, Z. Sandor, I. Kincses, and A. Guttman, Determination of complex type free, non-conjugated oligosaccharide glucose unit values in tomato xylem sap for early detection of nutrient deficiency. *Electrophoresis*, 2021. 42(3): p. 200-205.
24. Reider, B., G. Jarvas, J. Krenkova, and A. Guttman, Separation based characterization methods for the N-glycosylation analysis of prostate-specific antigen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021. 194.
25. Sarkozy, D., B. Borza, A. Domokos, E. Varadi, M. Szigeti, A. Meszaros-Matwiejuk, D. Molnar-Gabor, and A. Guttman, Ultrafast high-resolution analysis of human milk oligosaccharides by multicapillary gel electrophoresis. *Food Chemistry*, 2021. 341.