PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

Bakteriális endotoxinok jellemzése chip technikával, szerkezet és immunfunkció kapcsolata

PhD értekezés

Makszin Lilla

Témavezetők:

Dr. Kilár Ferenc

egyetemi tanár

Dr. Kocsis Béla

egyetemi docens

PÉCS, 2015

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK **2**

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE (ANGOLUL ÉS MAGYARUL) **4**

1 BEVEZETÉS **6**

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS **7**

2.1 A GRAM-NEGATÍV SEJTFAL 7

2.2 AZ ENDOTOXINOK HATÁSA 8

2.3 AZ ENDOTOXINOK SZERKEZETE 10

2.4 ENDOTOXINOK VIZSGÁLATA 13

2.4.1 Nyúl teszt *14*

2.4.2 LAL-teszt *15*

2.4.3 Az endotoxinok szerkezetvizsgálata elektroforetikus módszerekkel *15*

2.4.3.1 SDS-PAGE 15

2.4.3.2 Kapilláris elektroforézis 16

2.4.3.3 Mikrochip elektroforézis 19

2.4.3.4 Mikrochip gélelektroforézis (MGE) 20

2.5 ENDOTOXINOK SZEROLÓGIAI KERESZTREAKCIÓI 22

2.6 ENDOTOXINOK VÖRÖSVÉRTEST CITOPLAZMA MEMBRÁNOKRA GYAKOROLT HATÁSA 25

3 CÉLKITŰZÉSEK **26**

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK **27**

4.1 FELHASZNÁLT ANYAGOK 27

4.2 FELHASZNÁLT BAKTÉRIUMTÖRZSEK 27

4.3 BAKTÉRIUMTENYÉSZTÉS 27

4.4 ENDOTOXINOK, LIPID A, O-ANTIGÉNEK 28

4.5 OSZLOPKROMATOGRÁFIA 28

4.6 ENDOTOXINOK KINYERÉSE BAKTÉRIUM SEJTLIZÁTUMBÓL 29

4.7 MIKROCHIP GÉLELEKTROFORÉZIS MÓDSZERFEJLESZTÉS 29

4.8 MALDI-TOF TÖMEGSPEKTROMETRIA 32

4.9 MIKROCHIP ZÓNAELEKTROFORÉZIS MÓDSZER KIDOLGOZÁSA 32

4.10 ANTITEST TERMELÉS 34

4.11 ELISA 34

4.12 GÁZKROMATOGRÁFIA – TÖMEGSPEKTROMETRIA 35

4.13 ENDOTOXINOK KÖLCSÖNHATÁSÁNAK VIZSGÁLATA MGE ÉS EPR MÓDSZEREKKEL 36

5 EREDMÉNYEK **38**

5.1 MIKROCHIP GÉLELEKTROFORÉZIS MÓDSZERFEJLESZTÉS LIPOPOLISZACHARIDOK SZERKEZETI JELLEMZÉSÉRE 38

5.1.1 Szerkezeti típus szerinti osztályozás *38*

5.1.2 Sejtlizátumok vizsgálata *45*

5.1.3 LPS kivonat komponensek molekulatömegének meghatározása *47*

5.1.4 Degradált O-poliszacharidok kimutatása MGE módszerrel *50*

5.2 SZEROLÓGIAI KERESZTKAPCSOLATOK ÉS SZERKEZETI HÁTTERÜK VIZSGÁLATA 51

5.2.1 Jellemzés ELISA-tesztekkel *51*

5.2.2 Mikrochip gélelektroforézis *53*

5.2.3 O-poliszacharidok GC-MS vizsgálata *54*

5.3 ENDOTOXINOK VIZSGÁLATA MZE MÓDSZERREL 56

5.4 ENDOTOXINOK VÖRÖSVÉRTEST MEMBRÁNRA GYAKOROLT HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA 60

6. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE **62**

7. ÖSSZEFOGLALÁS **70**

IRODALOMJEGYZÉK **71**

MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK **77**

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS **81**

Rövidítések jegyzéke (angolul és magyarul)

5-SASL	5-(4',4'-dimethyloxazolidine-N-oxyl) stearic acid; 5-(4',4-dimetil-oxazolidin-N-oxil) sztearinsav
Ara	arabinose; arabinóz
BSA	bovine serum albumin; marhaszérum-albumin
CD	cluster of differentiation; differenciációs klaszter
CZE	capillary zone electrophoresis; kapilláris zónaelektroforézis
Col	colitose; kolitóz
DMSO	dimethyl-sulfoxid; dimetil-szulfoxid
DPS	degraded polysaccharide; degradált poliszacharid
DS	destaining solution; festékmentesítő oldat
DTT	dithiothreitol; ditiotreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid; etilén-diamin-tetraecetsav
EI	electron ionization; elektron ionizáció (elektronütközés)
EOF	electroosmotic flow; elektroozmotikus áramlás
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay; enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat
EPR	electron paramagnetic resonance; elektron paramágneses rezonancia
Fuc	fucose; fukóz
Gal	galactose; galaktóz
GalNAc	N-acetyl-galactosamine; N-acetil-galaktózamin
GC-MS	gas chromatography-mass spectroscopy; gázkromatográfia-tömegspektroszkópia
Glc	glucose; glükóz
GlcA	glucuronic acid; glükuronsav
GlcNAc	N-acetyl-glucosamine; N-acetil-glükózamin
Hb	hemoglobine, hemoglobin
HUS	hemolytic uremic syndrome; hemolitikus urémiás szindróma
HWHH	half-width at half-height; félértékszélesség
IL	interleukin
IgG	immunoglobuline G; immunglobulin G
Kdo	3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid; 3- deoxi-D-manno-2-oktulonsav
LAL	Limulus amebocyte lysate; Limulus amöbocita lizátum

LBP	lipopolysaccharide binding protein; lipopoliszacharid-kötő fehérje
LIF	laser-induced fluorescence; lézerindukált fluoreszcencia
LOD	limit of detection; kimutatási határ
LOS	lipooligosaccharide; lipooligoszacharid
LPS	lipopolysaccharide; lipopoliszacharid
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization; mátrixszal segített lézer deszorpciós ionizáció
Man	mannose; mannóz
ME	microchip electrophoresis; mikrochip elektroforézis
MGE	microchip gelelectrophoresis; mikrochip gélelektroforézis
MZE	microchip zone electrophoresis; mikrochip zónaelektroforézis
MS	mass spectrometry; tömegspektrometria
NHS	N-hydroxysuccinimide; N-hidroxi-szukcinimid
NMR	nuclear magnetic resonance; mágneses magrezonancia
OD	optical density; optikai denzitás
OMP	outer membrane protein; külső membrán fehérje
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid-gélelektroforézis
PBS	phosphate-buffered saline; foszfát-pufferelt sóoldat
PCP	phenol-chloroform-petroleum ether; fenol-kloroform-petroléter
Rha	rhamnose; ramnóz
SDS	sodium dodecyl sulfate; nátrium-dodecilszulfát
SLB	standard labeling buffer; standard jelölőpuffer
Tf	transferrin, transzferrin
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor; tumor nekrózis faktor
TOF	time of flight; repülési idő analizátor
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol; 2-amino-2-hidroximetil-propán 1,3-diol

1 Bevezetés

A vérben keringő, és általános fertőzést (vérmérgezést, szepszist) okozó baktériumok és egyéb kórokozók komoly problémát jelentenek az orvostudomány számára. A világon évente 18 millió embert érintenek ezek a fertőzések, és a halálozási arány 30-50% még a legmodernebb felszereléssel rendelkező kórházakban is (Hotchkiss & Karl, 2003.). A vérmérgezés fő oka a vérben található patogének (baktériumok, vírusok, gombák, egyéb mikrobák, és azok metabolitjai) jelenlétére adott immunválasz. Az adott kórokozó száma hirtelen növekedésnek indul, és az immunrendszer "túlreagálja" a fertőzést, ami által véralvadás, keringési pangás, ödémák, szisztémás gyulladás, szövetkárosítás, és végül szeptikus sokk kialakulásához vezethet megdöbbentően rövid idő alatt.

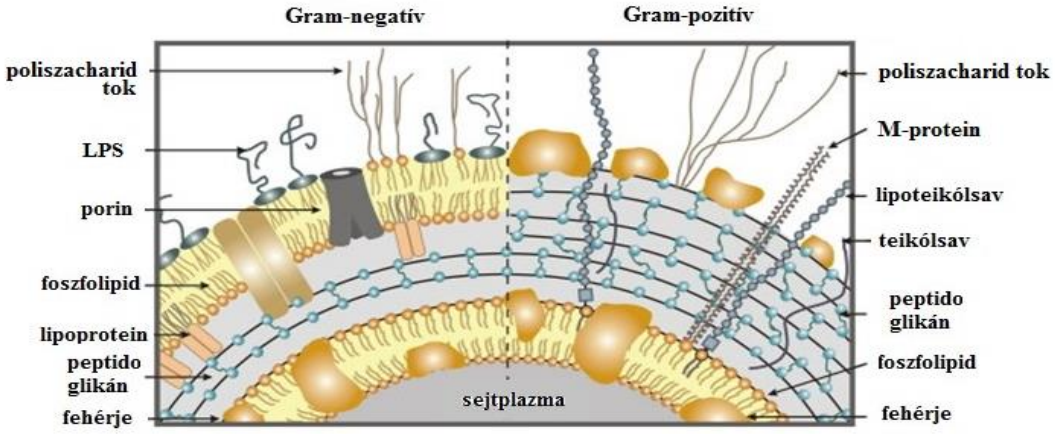
Az egyik probléma a szepszises esetek gyógyításával az, hogy nehéz azonosítani a fertőzésért felelős kórokozót, így a széles spektrumú antibiotikum kezelésen kívül gyakorlatilag nincs alternatív gyógymód. Ezeknek az antibiotikumoknak komoly mellékhatásaik vannak, és hosszantartó alkalmazásuk sajnos növeli a halálozási arányt. Az antibiotikumok a széteső baktériumokból jelentős mennyiségű endotoxint szabadítanak fel, mely egy beinduló láncreakció révén sokkhoz vezethet. Az antibiotikum-rezisztens baktériumtörzsek terjedése miatt a kezelés egyre több esetben hatástalan (Obrien, 1992.). Egészségügyi- és üzleti érdek is, hogy a bakteriális fertőzést, ezen belül is az eszközök és gyógyszerek endotoxinnal történő szennyeződését megelőzzék. Fontos minőségi követelmény, hogy az alkalmazott injektálható gyógyszerek, sebészeti eszközök, folyadékok, dializáló csövek sterilek és endotoxinmentesek legyenek. A gyártó cégek tekintélyes összegeket kénytelenek fordítani arra, hogy ezek a termékek valóban endotoxinok szennyezésétől mentesek legyenek. Így érthetővé válik, hogy miért növekszik az endotoxin meghatározásának üzleti jelentősége is. Az endotoxinnal történt kontamináció kimutatása és mértékének meghatározása a gyógyszer- és biotechnológiai folyamatok, valamint az egészségügyi szolgáltatások kritikus paramétere (*pl*. a hemodialízis rendszerek ellenőrzése).

Munkánkban az endotoxinok szerkezet-funkció kapcsolatával foglalkoztunk, amely lehetőséget nyújthat a diagnosztikai kérdések megválaszolásában, valamint a biológiai hatások mechanizmusának felderítésében.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 A Gram-negatív sejtfal

A mikroorganizmusok közül legnagyobb számban a Hans Christian Gram szerint pirosan festődő *ún*. Gram-negatív fajai (*Enterobacteriacae*) vannak jelen a bélflórában. A Gram-negatív sejtfal szerkezete a Gram-pozitívéhoz képest lényegesen összetettebb (**1. ábra**). A baktériumokat a külvilág felől a sejtfal határolja, mely több rétegből áll: citoplazmamembrán, peptidoglikán réteg, periplazmatikus tér és a külső membrán. Ezen keresztül zajlanak a transzport folyamatok illetve fontos szerepe van a baktériumsejtnek a környezet felszíneihez való kapcsolódásban, megbetegítőképességben és az immunológiai folyamatok elindításában. A Gram-negatív baktériumok peptidoglikán rétege lényegesen vékonyabb, mint a Gram-pozitív baktériumoké. Ez a réteg adja a baktérium stabil, rugalmas vázát, és fontos szerepe van a sejt növekedésében és osztódásában.

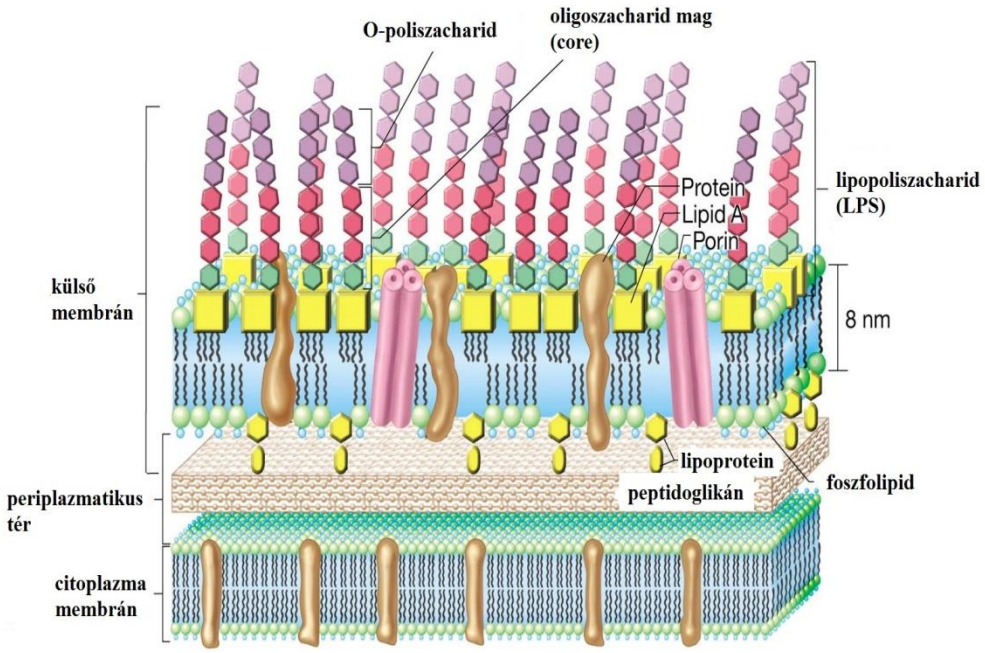


1. ábra A Gram-negatív és Gram-pozitív sejtfal szerkezetének összehasonlítása (Müller-Loennies *et al.*, 2007.)

A citoplazma és a külső membrán között található az *ún*. periplazmatikus tér. A periplazmatikus tér igen fontos a Gram-negatív baktériumok szempontjából. Számos oldott fehérje, hidrolázok, antibiotikum-degradáló enzimek, toxikus nehézfémeket hatástalanító anyagok, a kemotaxisban, transzportban szerepet játszó hordozó fehérjék találhatók benne. A

sejt oligoszacharidokat képes a periplazmába szekretálni, mely így ozmotikus pufferként szolgál a sejt és a külvilág között.

A periplazmatikus tér külső határa az *ún*. külső membrán (outer membrane, OM). A citoplazma membránhoz hasonlóan ez is egy foszfolipid kettős réteg, melyet jellegzetes komplex molekulák, a lipopoliszacharidok (LPS) alkotják (**2. ábra**). Igen toxikusak, és mivel a sejtből aktívan nem szekretálódnak, hanem a sejthez kapcsoltak, ezért endotoxinoknak nevezzük. A kétértékű kationok (Ca^{2+}, Mg^{2+}) és a foszfát (PO_4^{3-}) csoportok a membrán stabilitásáért felelősek (Tsai & Frasch, 1982.).



2. ábra A Gram-negatív sejtfal szerkezeti felépítése (Poinsot *et al.*, 2012.)

2.2 Az endotoxinok hatása

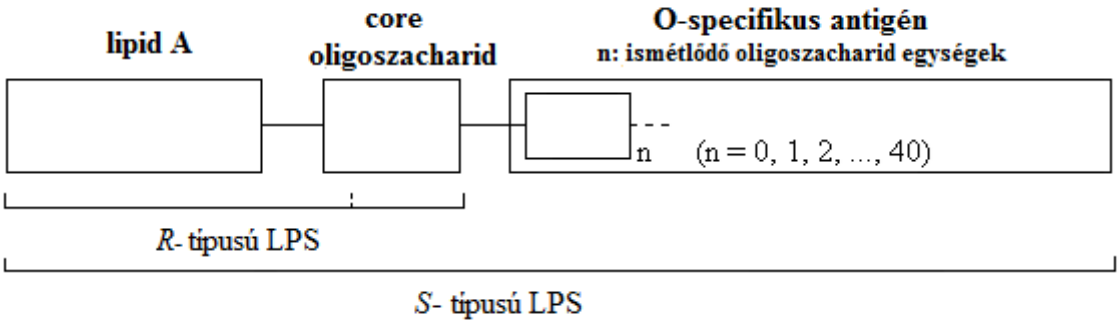
Az endotoxinok (kémiai szerkezete alapján lipopoliszacharidok, LPS molekulák) a Gram-negatív baktériumok (mint *pl. Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Proteus*, stb.) külső sejtmembránjának állandó alkotóeleme a membránfehérjék mellett (Caroff & Karibian, 2003.). Felszíni antigénekként fontos szerepet játszanak a testi sejtek és a patogén szervezetek kölcsönhatásában, fontos virulencia faktoroknak tekinthetők. *E. coli* esetében az LPS tartalom 10^6 molekula/sejt is lehet. A baktériumok szaporodása vagy lízise, szétesése után a véráramba kerülve számos fiziológiai és patofiziológiai hatást indukálnak. Az

endotoxinokat a szérum LPS kötő fehérjéi (LPS binding protein, LBP) szállítják célsejtjeihez: a mononukleáris fagocita rendszer sejtjeihez, a neutrofil granulocitákhoz, B limfocitákhoz és vérlemezkékhez. 2011-ben Bruce Beutler (USA) és Jules Hoffmann (Franciaország) „a természetes vagy veleszületett immunrendszer kutatásáért", valamint Ralph Steinman (Canada/USA) „a dendritikus sejtekkel kapcsolatos munkásságáért" megosztva nyerték el az orvosi Nobel-díjat. Bruce Beutler az LPS-receptor komplex leírásában jeleskedett. Az endotoxinok a sejtek felszínén található TLR4 és CD14 receptorokhoz kötődve aktiválják a makrofágokat, interleukin 1 és 6 (IL-1, IL-6) és tumor nekrózis faktor α (TNF-alfa) termelést. Az immunrendszer válaszreakciója függ a szervezetet stimuláló LPS-ek mennyiségétől (Ulmer *et al.*, 2002.). A mediátorok alacsony szintje esetén – mint ami *pl.* a bél normál flórájából fiziológiásan éri el a szervezetet – azok **jótékony hatása** érvényesül. Ilyenkor az enyhe láz, az immunrendszer általános serkentése segíti a szervezetet a fertőzések leküzdésében, valamint a daganatos sejtek burjánzásának gátlásában. A lokális fertőzések során felszaporodó kis endotoxin mennyiség az immunrendszeren keresztül gyulladásos reakciót indít be, így hozzájárul az immunrendszer normál működésének fenntartásához. A valószínűen elviselhető maximum endotoxin dózis parenterális felvétel által 35 ng vagy 0,5 ng/testtömeg kg/nap a 70 kg-nál alacsonyabb testtömegű személyek esetén (1 ng = 1 EU, endotoxin egység) (Freitag *et al.*, 1997.).

Nagy mennyiségű, a szervezetet elárasztó endotoxin hatására – mint ami *pl.* Gram-negatív szepszis vagy endotoxinokkal kontaminált folyadék infúziója kapcsán kerül a szervezetbe – már szisztémás, **káros hatások** érvényesülnek. A bakteriális endotoxinok kölcsönhatásba lépnek a véralkotókkal, úgymint vörösvértestekkel, mononukleáris sejtekkel, vérlemezkékkel, neutrofilokkal, lipoproteinekkel, valamint vérplazma fehérjékkel. A nagyszámú citokin felszabadulás következménye a magas láz mellett a pulzusszám és légzésszám emelkedés, fehérvérsejtszám csökkenés, a szívizom kontrakciós erejének csökkenése, a kisvénák és a kapillárisok endothélsejtjeinek a sérülése, vérnyomásesés, csontvelő-, membrán- és magzatkárosodás. Metabolikus acidózis áll be, a véralvadási rendszer túlműködése miatt véralvadás, érpályán belül disseminált intravasculáris koaguláció jön létre. Mindennek következménye a többszervi elégtelenség, az *ún.* **endotoxin sokk**, amely súlyos esetekben – a kezelés elhanyagolásakor – halálos kimenetelű is lehet (Holst *et al.*, 1996.).

2.3 Az endotoxinok szerkezete

A lipopoliszacharid molekulákat bakteriológiai, szerológiai, kémiai, immunkémiai, genetikai és biológiai tulajdonságai alapján három szerkezeti egységre oszthatjuk (**3. ábra**) (Lüderitz *et al.*, 1982.).



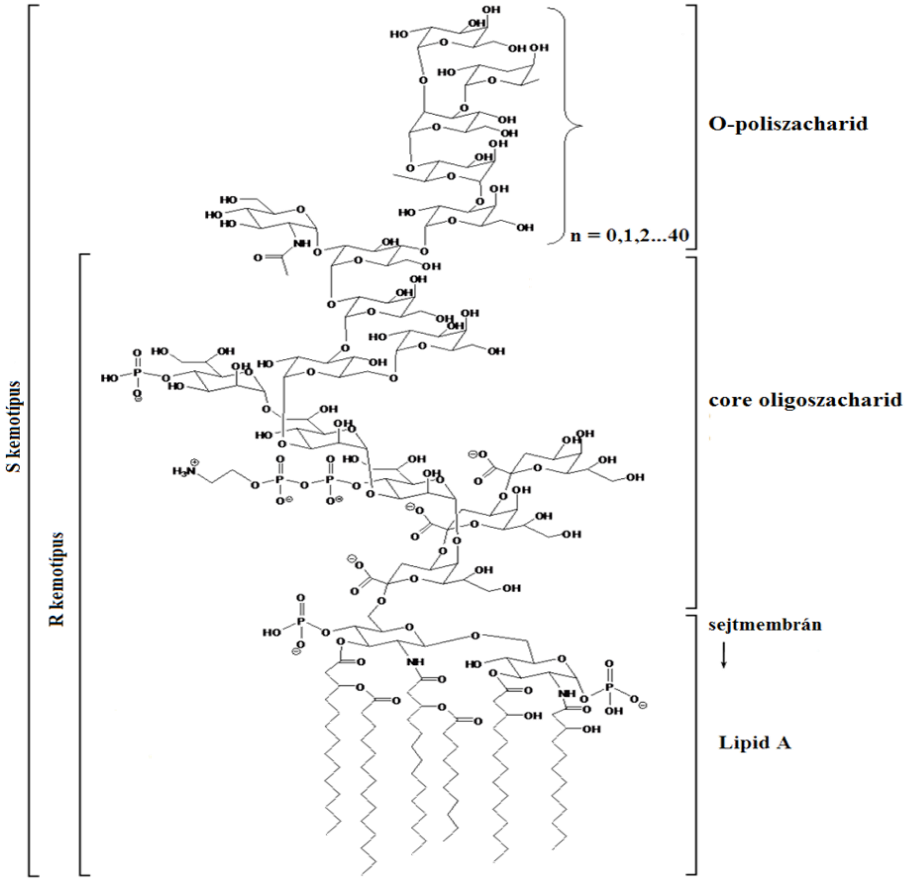
3. ábra A Gram-negatív baktériumokból származó endotoxinok általános szerkezete. n: az ismétlődő egységek száma: R-típusú endotoxinoknál n = 0; SR-típusú endotoxinoknál n = 1 (Kocsis *et al.*, 2011a.)

A sima (S-smooth) telepeket képző, vad típusú Gram-negatív baktériumokból származó amfifil, S-típusú LPS komponensek (Magalhaes *et al.*, 2007.) tartalmaznak egy hidrofób lipid régiót (neve lipid A), mely kovalensen kapcsolódik a hidrofil *ún.* core oligoszacharid régióhoz. A core oligoszacharid régió glikozidos kötéseken keresztül kapcsolódik a különböző számú ismétlődő oligoszacharid egységből álló poliszacharid régióhoz (neve O-oldallánc vagy O-specifikus antigén). Egy intakt lipopoliszacharid (LPS) szerkezete látható a **4. ábrán** (Caroff & Karibian, 2003.).

Egy genetikai mutáció (spontán vagy indukált) bekövetkezése esetén előfordulhat, hogy az O-oldallánc nem szintetizálódik. Ilyen esetekben a kémiailag lipooligoszacharidokat (LOS) hordozó baktériumok rücskös (R-rough) telepeket képeznek elvesztve eredeti megbetegítő képességüket. Ezeket a törzseket R-mutánsoknak nevezik. Vannak olyan Gram-negatív baktériumok is, amelyek mutáció nélkül is eleve O-oldallánc nélküli LOS-t termelnek, mint például a *Neisseria meningitidis*.

A **lipid A** a lipopoliszacharid legbelső, egyben a legkevésbé variábilis része. Főként glükózaminból, foszfátcsoportból és hosszú szénláncú zsírsavakból áll. Általános felépítésére jellemző a heptaacilált, biszfoszforilált diglükózamin forma. A molekula vázát két foszforilált D-glükózamin képezi, szokatlan módon (β-1→6 kötésben) kapcsolódva egymáshoz.

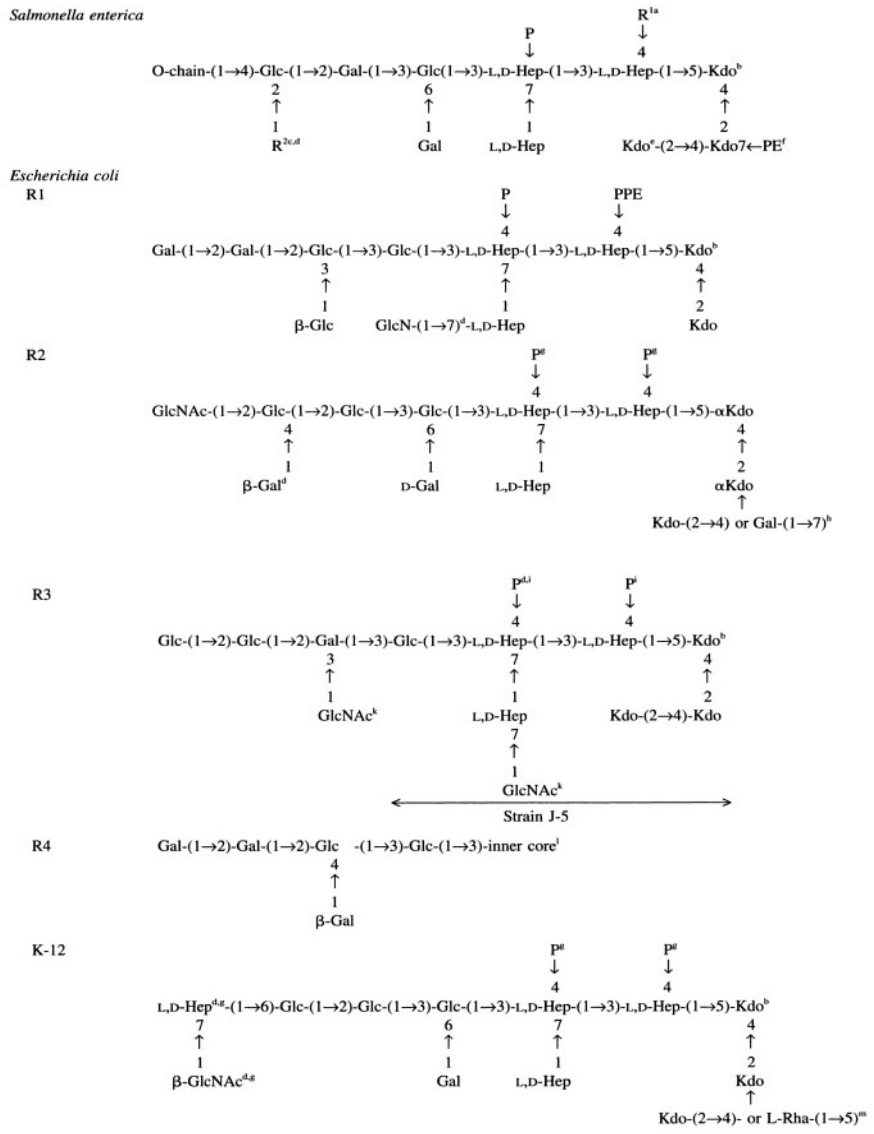
A biszfoszforilált diglükózamin vázra, amid és észter kötéssel hosszú szénláncú zsírsavak kötődnek: laurinsav (C12), mirisztinsav (C14), palmitinsav (C16), sztearinsav (C18) és β-hidroxilált származékaik. A zsírsavak biztosítják a lipopoliszacharid hidrofóbicitását és lipofil jellegét, mely lehetővé teszi a membrán lipid kettős rétegébe való beágyazódását. A lipid A-t tekintik a lipopoliszacharid endotoxikus tulajdonságáért felelős részének (Brade *et al.*, 1988., Rietschel *et al.*, 1993.). A baktérium külső membránjának stabilitását a kétértékű ionok (Ca^{2+}, Mg^{2+}) és a lipid A-ban található foszfát (PO_4^{3-}) csoportok nagymértékben elősegítik.



4. ábra Egy intakt lipopoliszacharid (LPS) szerkezete (Caroff & Karibian, 2003.)

A foszfát csoportokhoz kötődő pozitív töltésű szubsztituensek növelik a baktérium ellenállóképességét az antibiotikumokkal szemben. A lipid A háromdimenziós szerkezete (kúp vagy henger alakzat) függ a foszfát csoportok számától, a zsírsavak típusától, számától és térbeli elhelyezkedésétől. A különböző konformációs alakok meghatározó tényezői az endotoxikus aktivitásnak. A kúpos alakzatú lipid A molekulák nagymértékben toxikus és citokin indukálók, míg a henger alakzattal rendelkezők mérsékelten mérgezők és citokin alig indukálók (Brandenburg *et al.*, 1993.).

Az **oligoszacharid régió (core)** a lipid A felé eső belső magra és az O-specifikus oldallánchoz kötődő külső magra különül el. A belső mag általában heptózt (gyakrabban L-glicero-D-manno heptóz, ritkábban D-glicero-D-manno-heptóz) (Kontrohr & Kocsis, 1981.) valamint ritka előfordulású 3-deoxi-D-manno-2-oktulonsavat (Kdo) tartalmaz. A Kdo savlabilis ketozidos kötéssel α-2→6' kapcsolódik a lipid A részhez, emiatt gyenge savas hidrolízis alkalmazásával (pH=3-5), magas hőmérsékleten (100°C) a lipid A és a poliszacharid rész egymástól elválasztható, ezáltal kémiai és biológiai tulajdonságai vizsgálhatók. A külső mag általában különböző hexózokból [(D-galaktóz (Gal), D-glükóz (Glc), N-acetil-glükózamin (GlcNAc)] épül fel nagyobb variabilitással. Hat különféle magszerkezet ismert (*Salmonella Ra, E. coli R1, R2, R3, R4* és *K-12*) (**5. ábra**).



5. ábra Enterobakteriális oligoszacharidok régióinak különböző magszerkezetei (Holst, 1999.)

A core oligoszacharidhoz kapcsolódik az LPS legkülső része, az *ún*. **O-specifikus oldallánc**, mely a Gram-negatív baktériumok fő felszíni antigénjét, az *ún*. sejtfal (O-antigén) antigénjét adja. Az O-specifikus oldallánc 1-8 cukormolekulából álló [gyakrabban: Glc, Gal, mannóz (Man), ramnóz (Rha), GlcNAc, N-acetil-galaktózamin (GalcNAc); ritkábban: arabinóz (Ara), kolitóz (Col), abequose (Abe), fukóz (Fuc), glükuronsav (GlcA)…] egységek polimerje.

Az endotoxinok igen nagy kémiai (összetétel, ismétlődő egységek száma) és ennek következtében antigenitásbeli változatosságot mutatnak, így a legtöbb Gram-negatív baktérium szerológiai csoportosításának és a keresztkapcsolatoknak az alapját képezik. A hosszú poliszacharid oldalláncok a sejt felszínének kifejezett hidrofil tulajdonságot biztosítanak.

Az LPS-ek jelenléte minden szerves molekula sejtbe történő bejutását képes megnehezíteni. A külső, hidrofil O-specifikus oldallánc a hidrofób molekulák (sok antibiotikum) behatolását akadályozza, míg az LPS-ek belső, hidrofób része a hidrofil molekuláknak szab gátat.

Nehezíti a kutatók dolgát, hogy a kémiai szerkezet függvényében az endotoxinok molekulatömege is változó. A molekulatömeg változásának oka lehet, hogy az endotoxin molekulák vizes oldatban spontán aggregálódhatnak a lipid A-n keresztül, továbbá az acil-láncokon keresztül nem-poláros kölcsönhatások is kialakulhatnak a szomszédos molekulákkal. A kétértékű kationok (Ca^{2+}, Mg^{2+}) a foszfát csoportok között hídkötéseket alakíthatnak ki, ezáltal aggregátumokat képezhetnek és micelláris struktúrát alkothatnak. A kialakult aggregátumok molekulatömege elérheti az 1 MDa-t is, szemben a 10-20 kDa-os monomer molekulatömegével. Nagy koncentrátum esetén vezikulák (r=100 nm) is létrejöhetnek, amelyek nagyon stabil képződmények. Az aggregátumok és micellák kialakulása megelőzhető polymyxin B antibiotikum, epesavak vagy kelátorok (*pl*. EDTA) adagolásával.

2.4 Endotoxinok vizsgálata

Teljes emberi vérből, plazmából, vagy szérumból történő endotoxin meghatározás a mai napig nem rutin feladat. A méréshez szükséges enzimreakciókra a vér alkotórészei jelentős hatással vannak, általában gátlást fejtenek ki. A mai álláspont szerint az emberi „lázküszöb” endotoxin koncentráció tartománya (Human Fever Threshold) *kb*. 25-30 pg LPS/ml-re tehető, amelyet

egy átlag, egészséges populációra vonatkoztathatunk. Nyulaknál ez az érték 50-350 pg LPS/ml között változik, érzékenységüktől függően.

Az endotoxinok aktivitása a sterilizációs eljárást követően is megmarad, mivel hőstabil komplexek. Ebből kifolyólag az oldatok endotoxin-mentesítése nem megoldott, ezért a kimutatásuk és mennyiségi meghatározásuk rendkívül fontos feladat. Az endotoxinok detektálása nélkülözhetetlen olyan klinikai környezetben, ahol az eszközökön kialakult biofilm, vagy a direkt kontamináció mikrobiológiai szennyezést okozhat. Ilyen területek például: a hemodialízisben használt oldatok, infúziós-, injekciós-, illetve vérkészítmények, orvosi segédeszközök tisztasága. Fontos az endotoxinok meghatározása gyógyszertáraknál, különösen nukleális gyógyszerekkel foglalkozóknál, transzplantációs központoknál, elektronikai (chipgyártás) és kozmetikai iparnál, szövettenyésztő tápoldatok, élelmiszerek és környezetvédelmi minták vizsgálatánál, víztisztító rendszerek és berendezések monitorozásánál, a repülőgépiparban és olyan ipari alkalmazásoknál, ahol mikroba-mentes felületek szükségesek. Az endotoxin-mentesség szükséges továbbá a kutatólaboratóriumokban, ahol ultratiszta víz az előírás, felülettisztítási alkalmazásnál, ahol a sterilitás és pirogénmentesség nagyon fontos követelmény (kórházak, műtők, *stb.*). Kiemelt szerepe van a endotoxinok gyors, érzékeny kvalitatív és kvantitatív meghatározásának a humán diagnosztika területén.

Az endotoxinok koncentrációjának a meghatározása, méréstechnikai szempontból két, standardizált módszer szerint végezhető. Az egyik az *in vivo ún. nyúl-teszt*, míg a másik az *in vitro* LAL (Limulus amöbocita lizátum) teszt.

2.4.1 Nyúl teszt

Különösen fontos a különböző gyógyszerek és az orvos-biológiai kísérletek során használt anyagok pirogén tartalmának ismerete, amit korábban kísérleti állatok (elsősorban nyulak) testhőmérsékletének mérésével vizsgáltak. A nyulat a fülén intravénásan beoltva a vizsgálandó mintával, figyelték a nyúl testhőmérsékletének változását. Lázas reakció esetén a minta endotoxinokat tartalmazott. Ennek a módszernek több hátránya is van. Az anyagi és etikai kérdéseken túl a módszer nagyon időigényes és nem kvantitatív. Továbbá az is nehézséget okoz, hogy nem lehet különbséget tenni endotoxinok és egyéb pirogének között (Hasiwa *et al.*, 2013.).

2.4.2 LAL-teszt

Fontos előrelépés volt a jóval egyszerűbb LAL (L*imulus* A*mebocyta* L*ysate*) módszer kidolgozása, amivel lehetővé vált az endotoxinok szemi-kvantitatív meghatározása. Az 1950-es években *Bang* és *Levin* kimutatta, hogy az atlanti tőrfarkú rák (*Limulus Polyphemus*) limfájában keringő amöbocitákat, illetve a belölük készítetett lizátumot – enzimatikus folyamatok eredményeként – *in vitro* körülmények között is koagulálják a Gram-negatív baktériumok. Ez a LAL-teszt alapja, ami lehetővé teszi a laboratóriumi gyakorlatban a vizsgálandó minta endotoxin-tartalmának kimutatását. A teszt során az amöbocitákból előállított LAL-reagens az endotoxinokkal reakcióba lépve masszív gélképződést, megnövekedett viszkozitást és opaleszkálást vált ki, mely színreakcióval kimutatható. Ezzel az eljárással akár pikogramnyi endotoxint is ki lehet mutatni, azonban egyéb pirogének *pl.* glukánok jelenlétében előfordulhat nem specifikus (nem endotoxinok által okozott) LAL-aktiváció is (Hasiwa *et al.*, 2013.). Sajnos a LAL módszerek érzékenysége (*kb*. 0,2 ng/ml), bár más tekintetben kiválók, annyira a szükséges mérési határon mozognak a vérminták esetében, hogy azok csak „kiemelkedően" magas endotoxin koncentrációk esetében adhatnak szignifikáns eredményt. A módszer támogatását az FDA (Food and Drug Administration) elavultságra hivatkozva 2012-ben visszavonta.

2.4.3 Az endotoxinok szerkezetvizsgálata elektroforetikus módszerekkel

Az endotoxinok strukturális vizsgálata, jellemzése rendkívül fontos, mivel fiziológiai és patofiziológiai hatásukat a kémiai szerkezetük nagymértékben befolyásolja. A szerkezet-funkció pontosabb megismerése érdekében gyors és érzékeny módszerekre van szükség.

2.4.3.1 SDS-PAGE

Az intakt LPS molekulák vizsgálata és kemotípus (S-, R-típus) szerinti osztályozása ezüstfestéssel kombinált SDS-PAGE módszerrel ma már rutin feladatnak számít (Tsai & Frasch, 1982.). Ezzel a módszerrel akár 18 LPS minta vizsgálható 24 órán belül, *pl.* BioRad MiniProtean rendszerrel. A frontvonal közelébe eső, általában széles, diffúz sávok megfeleltethetők az R-típusú szerkezeteknek (lipid A és core oligoszacharid), míg a jellegzetes létraszerű mintázat a növekvő számú ismétlődő egységet tartalmazó, O-

oldallánccal rendelkező S-típusú szerkezeteknek feleltethető meg. Az ezüstfestéses előhívás után megjelenő „létra-mintázat” megadja az adott LPS-re jellemző O-poliszacharid oldallánc ismétlődő egységeinek számát. Ezzel a technikával tehát egyrészt tanulmányozni lehet az endotoxinok szerkezeti változatait és az egyes endotoxin kivonatokban levő LPS keverék komponenseinek relatív mennyiségét, ám a molekulatömeg meghatározás a megfelelő molekulatömeg standard hiányában nehézségekbe ütközik.

A módszer nagy érzékenységű, azonban idő- és vegyszerigényes.

2.4.3.2 Kapilláris elektroforézis

A kapilláris elektroforézis során az elválasztás a kapillárisban lévő háttérelektrolitban elektromos erőtér hatására megy végbe, az elválasztás a mintakomponensek eltérő vándorlási sebességén, különböző töltés/tömeg arányukon alapul. Kvarc kapillárisban az elválasztott molekulák sorrendje: kationok, semleges molekulák, anionok. A vándorlási sebesség egyenesen arányos az elektroforetikus mozgékonysággal (μ_e) és az elektromos térerősséggel (E).

Az elektroforetikus mozgékonyság (mobilitás) egyenesen arányos a részecske töltésével (q), és fordítottan arányos a részecske hidrodinamikai sugarával (r), és a közeg viszkozitásával (η).

A kapilláris rendkívül kis átmérőjének (20-200 μm) következtében megnő a felület/térfogat arány, ami nagy elektromos ellenállásánál fogva nagy térerő (100-500 V/cm) alkalmazását csekély hőfejlődés mellett teszi lehetővé. A nagy felület jó hőelvezetést biztosít, így nagy feszültség alkalmazható. Ez lecsökkenti az analízis idejét, csökken a csúcsszélesedés mértéke és nagy elválasztási hatékonyságot és felbontást biztosít. A módszer hatékonysága szempontjából alapvető az is, hogy a kis átmérő következtében az elektroozmotikus áramlás során a kapillárisban levő folyadékoszlop dugószerűen mozdul el, ami jelentős mértékben hozzájárul a nagy elméleti tányérszám eléréséhez.

A töltött felületen adszorbeálódó ellenionok elektromos kettősréteget hoznak létre, ami az *ún.* zétapotenciál (ζ) kialakulásához vezet. Egyenfeszültség hatására a diffúz kettősréteg elmozdul, ez az elektroozmotikus áramlás (EOF). A kis belső átmérő esetén a hidratált ellenionok elmozdulása az összoldószer dugószerű elmozdulását eredményezi. Kvarc kapilláris esetén a szilanolcsoportok (SiOH) disszociációja negatív felületet eredményez, az

EOF tehát a katód (−) felé irányul. Az EOF nagysága függ az elektromos térerősségtől, a hőmérséklettől, a puffer összetételétől, viszkozitásától, ionerősségétől, pH-jától. Az elválasztáshoz leggyakrabban foszfát, borát, citrát puffert alkalmaznak.

A vizsgált ion vándorlási sebességét E erősségű elektromos erőtérben az anyag elektroforetikus mozgékonysága (mobilitása) és a pufferoldat kapillárison belüli elektroozmotikus mozgékonysága szabja meg. Az oldott anyag elektroforetikus mozgékonysága (μ) az oldott anyag tulajdonságától (elektromos töltés, molekulaméret és alak) és a vándorlás közegéül szolgáló pufferoldat tulajdonságától (elektrolit típusa, ionerősség, pH, viszkozitás és adalékanyagok) függ (Altria, 1999, Oda & Landers, 1997.).

Az elválasztás optimalizálása összetett folyamat, ahol néhány elválasztási paraméternek nagy szerepe lehet. Az elválasztási módszerek kidolgozásánál figyelembe veendő fő tényezők a készülék és az elektrolitoldat paraméterei.

Feszültség: Az elválasztás ideje az alkalmazott feszültséggel fordítottan arányos. A feszültség növelése azonban túlzott mértékű hőtermelődéshez, emiatt hőmérsékletemelkedéshez, és ennek eredményeképpen a kapillárison belül a pufferoldatban viszkozitásgradiens kialakulásához vezethet. Ez a hatás zónaszélesedést és így felbontáscsökkenést okozhat.

Polaritás: Az elektród polaritás lehet normál (anód a bemenetnél, katód a kimenetnél) és az elektroozmotikus áramlás a katód irányába történik. Ha az elektródok polaritása felcserélődik, akkor az elektroozmotikus áramlás a kimenettől a bemenet irányába mutat, és csak azok a töltéssel rendelkező részecskék jutnak el a kimenethez, melyeknek az elektroforetikus mozgékonysága nagyobb az elektroozmotikus áramlásnál.

Hőmérséklet: A hőmérséklet hatással van a pufferoldat viszkozitására (2-3 %-kal változik ^{o}C-ként), az elektromos vezetőképességre, és emiatt a vándorlási sebességre. Néhány esetben a kapilláris hőmérsékletének emelkedése a fehérjék konformációs változását és emiatt vándorlási idejük és elválasztásuk hatékonyságának változását idézheti elő.

Kapilláris: A kapilláris mérete (hossz és belső átmérő) befolyásolja az analízis idejét, az elválás hatékonyságát és az injektálható anyag mennyiségét. A teljes hossz növelésével az elektromos térerősség csökken (állandó feszültség alkalmazása esetén), ami megnöveli a vándorlás idejét. Adott tompítóoldat és elektromos térerősség esetén a hőleadás és emiatt a sávszélesedés a kapilláris belső átmérőjétől függ. Ez utóbbi hatással van a kimutatási határra is, az injektált minta térfogatától és az alkalmazott detektálási módtól függően.

Pufferoldat típusa és koncentrációja: A kapilláris elektroforézis céljára az olyan pufferoldatok alkalmasak, melyek pufferkapacitása a választott pH-tartományban megfelelő és ionjainak mozgékonysága kicsi, emiatt minimális a létrehozott áramerősség nagysága. A sávtorzulás minimalizálása érdekében fontos, hogy ha lehetséges, a pufferoldat ionjainak és az oldott anyag ionjainak mozgékonysága hasonló legyen. Adott pH esetén a pufferoldat koncentrációjának (általában 1-500 mM közötti) növelése csökkenti az elektroozmotikus áramlást és az oldott anyag sebességét.

Pufferoldat pH-ja: A pH a meghatározandó anyag és az adalékanyagok töltésének módosításán és az elektroozmotikus áramlás változtatásán keresztül hat az elválasztásra. A különböző molekulák izoelektromos pontjának ismerete hasznos lehet a megfelelő pH-jú puffer kiválasztásához. A pufferoldat pH-jának növelése általában növeli az elektroozmotikus áramlást (Gáspár, 2000.).

A **kapilláris zónaelektroforézis** technikánál a kapilláris pufferrel töltött, a minta különböző komponensei diszkrét zónákban, eltérő sebességgel vándorolnak. Mindegyik sáv sebessége az oldott anyag elektroforetikus mozgékonyságától és a kapillárison belüli elektroozmotikus áramlástól függ (Poppe, 1998.).

Kromofór csoportot nem tartalmazó molekulák vizsgálata esetén az általános optikai detektorok (UV, Vis) nem alkalmazhatók. Az endotoxinok esetében kétféle megközelítéssel tették „láthatóvá” a vizsgált lipopoliszacharidokat. A fehérjékkel való kölcsönhatást kihasználva, humán hemoglobin (Hb) vagy transzferrin (Tf) jelenlétében, a Hb/LPS vagy Tf/LPS komplexek formájában detektálták az endotoxinokat a fehérjék fényelnyelési hullámhosszán. A módszer lényege, hogy a fehérje/LPS komplexek a fehérjétől eltérő mobilitást (vándorlási idő) mutatnak. Az *E. coli*, *S. minnesota* és *Shigella sonnei* törzsekből izolált LPS-ek elektroforetikus profilja az S és R típusuktól függően változott. A kimutatási határérték (R típusú endotoxinok esetén) 50 μg/ml volt. Az LPS/Hb komplexek kimutatása orvosi szempontból is fontos lehet, hiszen *pl.* a Hb-tartalmú „mesterséges vérben” esetleg jelenlévő endotoxinok toxikus mellékhatásokat eredményeznek (Kilár *et al.*, 2006.).

A másik módszerben Freitag és *mtsai*. FITC fluoreszcens jelölőt alkalmaztak *Pseudomonas aeruginosa* LPS-ek detektálására (Freitag *et al.*, 1997.). A FITC előnye, hogy képes reagálni primer és szekunder amino csoportokkal is, mely funkciós csoportok az LPS core és lipid A részében megtalálhatók. A jelölt *P. aeruginosa* LPS több csúcs formájában jelent meg az elektroferogramon (3 és 7 perc között), a kimutatási határérték pedig 7 μg/ml volt. Az

irodalomban más törzsből származó LPS-ek fluoreszcens jelöléséről és hagyományos kapilláris elektroforetikus futtatásáról nem található információ.

2.4.3.3 Mikrochip elektroforézis

A mikrochip elektroforézis (ME) a kapilláris elektroforézisből fejlődött ki, napjaink legmodernebb elválasztástechnikai módszerei közé tartozik, mely biológiailag fontos molekulák – úgymint a fehérjék, DNS, RNS, *stb.*– gyors és hatékony elválasztására alkalmas.

Az úgynevezett „Lab-on-a-chip" technika lehetővé tesz számos, egymást követő műveleti lépést (*pl:* kémiai reakciók, mintaelőkészítés, elválasztás, háttérhígítás és detektálás) zárt rendszerben egyetlen mikrochipen (Chovan & Guttman, 2002.).

Számos előnye közé tartozik a kis anyagigény, gyorsaság és könnyű kezelhetőség, nagy érzékenység, felbontóképesség, jó reprodukálhatóság.

A molekulák elválasztása kisméretű üveglapba maratott, 13 µm mély és 36 µm széles csatornákban történik (Agilent Protein chip). A chip mérete 17,5 mm x 17,5 mm. A csatornák a mikrochip felszínén lévő nyílásokban végződnek, melyek az oldatok bejuttatására szolgálnak. A betöltő nyílásokba merülő elektródok képesek az egyes csatornákban különböző nagyságú és polaritású elektromos mező kialakítására, amely alkalmas a mikrochipen az anyagok mozgatására és a minták elektroforetikus elválasztására. A chipek működési elvét jól szemlélteti az *ún*. keresztcsatornás mikrochip (**6. ábra**).

6. ábra Keresztcsatornás mikrochip

Ezek a mikrochipek két, egymást keresztező csatornát tartalmaznak, melyek közül a rövidebb csatorna a minta injektálására, a hosszabb pedig az elektroforetikus elválasztásra szolgál.

Az elektroforézis első lépése a minta injektálása, ennek során a 4. tartályból a 2. tartályba áramolva megtölti a rövid csatornát és a két csatorna kereszteződését. Az ezt követő elválasztásban a mintának csak kis része vesz ténylegesen részt, amely az injektálás befejeződésével épp a kereszteződésben van (40 pl).

Az elválasztás során a feszültségek úgy vannak beállítva, hogy a kapillárisok kereszteződésében lévő molekulák a 3. hely felé mozdulnak el, a minta többi része viszont lassan visszavándorol a minta- (2. hely), illetve a gyűjtőtartályba (4. hely). Ennek köszönhetően a minta nem szivárog be az elválasztó csatornába és a létrejött „minta-dugó" éles csúcsokat ad. Az elválasztást követően történik a detektálás, a hosszanti kapillárisban, még a 3. mintagyűjtő előtt.

2.4.3.4 Mikrochip gélelektroforézis (MGE)

A gélelektroforézis során az elválasztás egy molekulaszűrő hatással rendelkező géllel töltött kapillárisban játszódik le. Azon molekulák melyeknek töltés/tömeg hányadosuk megegyezik, elválaszthatók molekulaméretük szerint, mivel a kisebb molekulák könnyebben jutnak át a gél hálón, és gyorsabban vándorolnak, mint a nagyobbak. Különböző biológiai makromolekulák (például fehérjék és DNS-szakaszok), melyeknek SDS asszociátumokban megegyezik a töltés/tömeg hányadosuk, a molekulatömegük szerint így gélelektroforézissel elválaszthatók.

A kis kapilláris-átmérő előnye, hogy kapillárisban lineáris polimerekkel is lehet elválasztást véghezvinni. Fontos a gél-hőmérséklet állandósága, a megfelelő pórusméret és az UV-fényelnyelés hiánya. A gél (vagy helyesebben „polimer hálózat") lehet kovalensen keresztkötött (*pl.* térhálós poliakrilamid), hidrogénkötéseket tartalmazó (*pl.* agaróz); vagy molekulaszűrő hatással rendelkező lineáris polimer (*pl.* lineáris akrilamid, dextrán, metilcellulóz, polietilénglikol, hidroxipropil-metil-cellulóz).

A térhálós gélekben az elválasztás az elválasztó pufferoldat változtatásával és a gél porozitásának szabályozásával (a gél készítése során) optimalizálható. A térhálós poliakrilamid gélek porozitását az akrilamid koncentrációjának és/vagy a keresztkötő komponens arányának módosításával lehet megváltoztatni. Szabályként elmondható, hogy a gél porozitásának csökkentése az oldott anyag mozgékonyságának csökkenéséhez vezet. Az

ilyen típusú gélek törékenysége miatt csak elektrokinetikus injektálás alkalmazható. A dinamikusan borított gélek hidrofil polimerek, mint például a lineáris poliakrilamid, a cellulóz-származékok, a dextrán *stb*., melyek a vizes elválasztó pufferoldatokban feloldhatók, és a feloldás eredményeképpen az elválasztó pufferoldat molekulaszűrőként is viselkedik. Ezek az elválasztó közegek könnyebben előállíthatók, mint a térhálós polimerek. Elkészíthetők egy üvegcsében és nyomás segítségével a bevont falú kapillárisba (elektroozmotikus áramlás kiküszöbölése) tölthetők. A gél porozitása növelhető nagy molekulatömegű polimerek alkalmazásával (adott polimerkoncentráció esetén) vagy a polimerkoncentráció csökkentésével (adott molekulatömeg esetén). A gél porozitásának csökkentése ugyanazon pufferoldat esetén az oldott anyag mozgékonyságának csökkenéséhez vezet. Mivel e polimerek oldásával a pufferoldat viszkozitása alacsony marad, hidrodinamikus és elektrokinetikus injektálási technika egyaránt alkalmazható (Li, 1992.).

Bousse *és mtsai.* kifejlesztették a fehérjék méretének, tisztaságának, mennyiségének, meghatározására is alkalmas, üveglapba maratott MGE rendszert (**9. ábra**) (Bousse *et al.*, 2001.).

A csatornákat mérés előtt mátrix oldattal töltik fel. A mátrixoldat nagy molekulatömegű polimer (poli-dimetil-akrilamid alapú lineáris polimer, PDMA) 3,25 % Tris-Tricin pufferben, pH: 7,6, mely 4 μM fluoreszcens festéket (melynek pontos összetétele nem ismert) és 0,25 % SDS-t (8,7 mM végkoncentrációban) is tartalmaz. A negatív töltésű SDS a peptid hidrofób részeihez kapcsolódva egyrészt megbontja a fehérje natív szerkezetét, másrészt méretarányos mennyiségben kapcsolódik a fehérjékhez, így a mérettel arányos negatív töltést ad azoknak. A fluoreszcens festék kötődik a fehérjék $–NH_2$ csoportjaihoz. Mivel a fehérjékben található diszulfid-hídakat az SDS nem képes megbontani, ezt a DTT hozzáadásával valósítják meg. Az elválasztó csatorna végén, egy csomópontban történik az SDS kritikus micella koncentrációja alatti hígítása a detektálási pont előtt. Erősen csökkenti a fluoreszcens hátteret, mely festék-SDS komplexből származik, és 1 nagyságrenddel növeli a jel amplitúdóját. Mind a chipen történő festés, mind az SDS hígítási lépések 100 ms-os időskálán belül történnek, és körülbelül 10^4-szer gyorsabb, mint a hagyományos SDS-PAGE. A minták detektálása lézer indukált fluoreszcens (LIF) detektorral (λ=635 nm vörös lézer dióda, 10 mW optikai teljesítmény) és fényemissziós dióda (LED) fluoreszcens detektorral (λ=470 nm, 2 mW optikai teljesítmény) történik (Bousse *et al.*, 2001.).

Az elektroforézis során kapott digitális jelek elektroferogram, gélkép, valamint adattáblázat formájában is megtekinthetők a mérést követően. Egy chip fél órán belül 11 minta futtatására alkalmas.

MGE módszerrel egyszerűen és gyorsan lehet tanulmányozni az endotoxinok szerkezeti változatait, ezen kívül az egyes LPS keverék komponensek relatív mennyiségi meghatározása is lehetséges. A tisztított LPS molekulák (Kilár *et al.*, 2008a.), illetve baktérium sejtlizátumából származó, részlegesen tisztított endotoxinok heterogenitásának (Kilár *et al.*, 2008b.) „ujjlenyomatszerű" mintázata vizsgálható LPS-SDS-fluoreszcens festék komplex alapján (Bousse *et al.*, 2001.), *Agilent Protein 80,* illetve *230 LabChip* kit használatával mikrochip elektroforézis módszerrel.

2.5 Endotoxinok szerológiai keresztreakciói

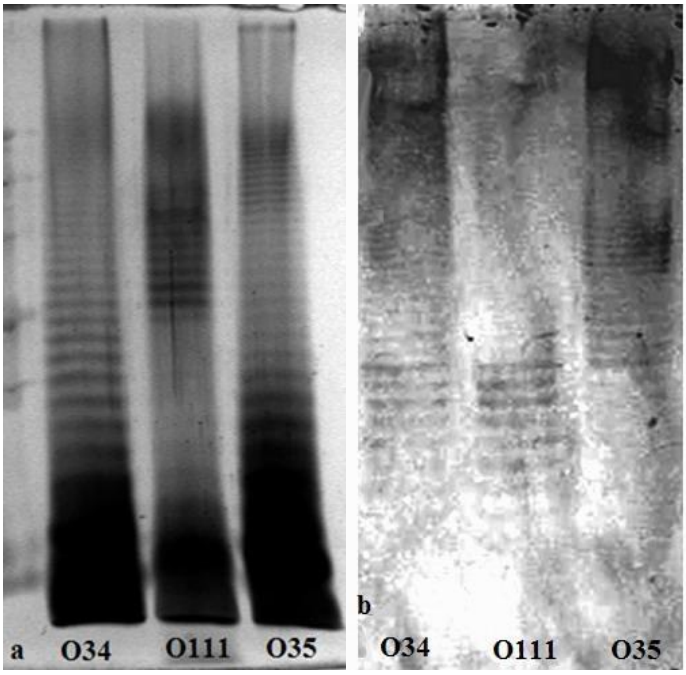
A baktériumok szerológiai jellemzése szükségszerű az egyes törzsek közötti szerkezeti hasonlóságok bizonyítására, szerológiai keresztkapcsolatok feltárására. Szerológiai keresztkapcsolatról beszélünk, amikor a különböző mikroorganizmusok hasonló vagy azonos antigént hordoznak, így az egyik mikroba ellen termelt ellenanyaggal (antitesttel) a másik mikroba is adja az immunreakciót. Gyakori, hogy az egymással keresztreagáló baktériumok egyazon genusba tartoznak, míg a genusok közötti szerocsoportok keresztreakciója ritkább.

Az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetben korábban több szempontból, részletesen vizsgált három enterobaktérium törzs esetében nagyon fontos kérdésként merült fel a szerológiai keresztkapcsolat megnyilvánulása. *Proteus morganii* O34, az *E. coli* O111:K58:B4, és a *Salmonella enterica sv. Adelaide* O35 fontos patogén mikrobák. A *Proteus morganii* O34, mint a genus többi tagja is húgyúti, bél- és sebfertőzéseket okoz, amelyek során a gazda-szövetekhez való kötődésben, a kolonizációban és a fennmaradásban a szervezet által ellene indított immunválasz sokszor hatástalan. Az *E. coli* O111:K58:B4 szerotípus az *E. coli* törzsek közül az első volt, melyet csecsemők székletéből sikerült azonosítani és a második leggyakoribb szerotípus izolátum, mely hemolitikus urémiás szindrómával (HUS) párosult vérzéses vastagbélgyulladást okoz (Beutin *et al.*, 2004.). A *S. enterica sv. Adelaide* O35 a többi *Salmonella* törzshöz hasonlóan hányással és hasmenéssel párosult bélgyulladást okoz, ami kiszáradáshoz vezethet (Coburn *et al.*, 2007.). Ezen patogének megkülönböztetése nagyon lényeges. Az *in vitro* immunológiai, csőagglutinációs és hemagglutinációs vizsgálatoknál, ugyanakkor, nem várt keresztreakciók jelentkeztek.

1967-ben Ralovich és Vörös (Ralovich & Vörös, 1967.), valamint Rauss és Vörös (Rauss & Vörös, 1967.) a *Proteus* (*Morganella*) *morganii* O34 (8662/64) és *E. coli* O111 közötti antigén kölcsönhatást írták le hővel elölt baktérium sejtekkel klasszikus csőagglutinációs vizsgálatok segítségével. A homológ és keresztreagáló szérumokkal folytatott mérésekre jellemző „titer" 1:1280/2560 szerológiai keresztreakciót jelzett.

A keresztkapcsolatok leírását célzó szerkezeti háttér tanulmányozása során több eredmény is született.

Az említett három baktériumból kivont endotoxinok ezüstfestéssel SDS-PAGE mintázata az S-típusú lipopoliszacharidokra jellemző karakterisztikus létraszerű mintázatot adott különböző O-poliszacharid oldallánc hosszúsággal (**7. ábra**).

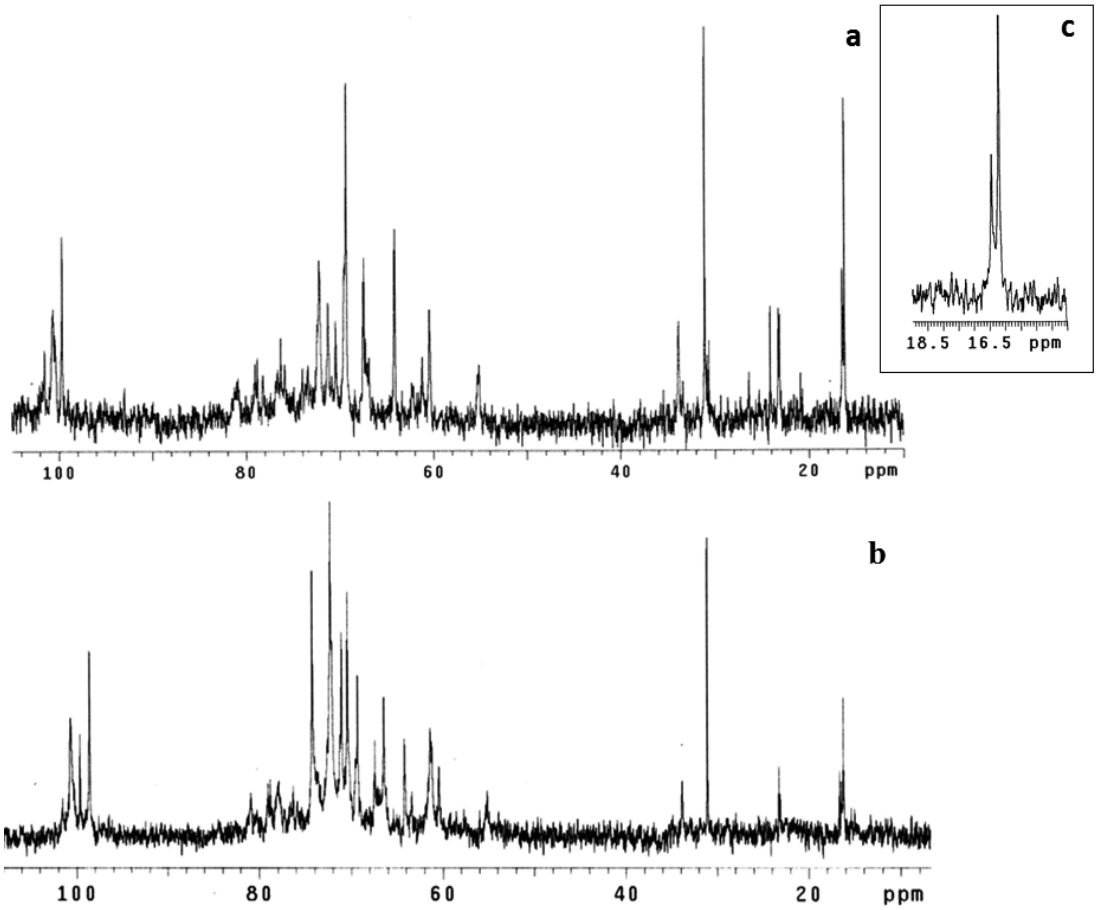


7. ábra *P. morganii* O34, *E. coli* O111 és *S. enterica sv. Adelaide* O35 lipopoliszacharidok ezüstfestéssel kombinált SDS-PAGE (a) és immunoblot (b) profiljai. Az immunoblot kísérletet *P. morganii* O34 baktériummal immunizált nyúl szérummal végezték. Azonos immunoblot eredményeket kaptak *E. coli* O111 és *S. enterica sv. Adelaide* O35 baktériummal immunizált nyúl szérumokkal is (Makszin *et al.*, 2015.).

A három törzs szerológiai és szerkezeti hasonlóságát bizonyítja az immunoblot vizsgálat is. A három endotoxin kivonatának komponenseit elektroforézissel elválasztották, majd nitrocellulóz membránra vitték át és mindhárom baktérium ellen termeltetett antiszérummal vizsgálták az immunológiai reaktivitást.

Az *E. coli* O111 és a *S. enterica sv. Adelaide* O35 endotoxinjainak esetében kimutatták az O-antigének szerkezete (Kenne *et al.*, 1983.) közötti azonosságot, amelynek genetikai alapjait is leírták (Wang & Reeves, 2000.). A három törzsből származó LPS létra mintázata alátámasztja azt a következtetést, hogy a szerológiai keresztreakciót az O-antigén szerkezet adja.

Az eddig legpontosabb módon a lipopoliszacharidok DPS-einek NMR vizsgálata adott lehetőséget a szerkezeti azonosság, vagy hasonlóság meghatározására (**8. ábra**). A három endotoxin esetén hasonló spektrumokat kaptak. A ^{13}C-NMR spektrometria egyértelműen kimutatta a kolitóz jelenlétét mindhárom baktériumból származó degradált poliszacharidokból. 16,5 ppm-nél kétfajta kolitóz detektálható különböző kémiai környezetben.



8. ábra *P. morganii* O34 (8662/64) (a) és *E. coli* O111 (b) degradált poliszacharidjainak ^{13}C-NMR spektrumjai. A bekeretezett spektrum (c) a mindkét DPS-ben jelenlévő kolitóznak a metil csoportját mutatja (Makszin *et al.*, 2015.).

2.6 Endotoxinok vörösvértest citoplazma membránokra gyakorolt hatása

A Gram-negatív szepszis és endotoxémia kapcsolatba hozható a vörösvértest membránjában bekövetkező változással. A bakteriális endotoxinok kölcsönhatásba lépnek a véralkotókkal úgymint vörösvértestekkel, mononukleáris sejtekkel, vérlemezkékkel, neutrofilokkal, lipoproteinekkel valamint vérplazma fehérjékkel. Carr *és mtsai.* egy kétlépcsős modellben igazolták a nem specifikus hidrofób kölcsönhatás létrejöttét a lipopoliszacharid molekulák, valamint a juh és nyúl vörösvérsejt membránok között. A hidrofób LPS molekulák, beépülve a vörösvérsejt membrán lipid kettősrétegébe, membrán-perturbációt okoznak, ami a membrán csökkent rugalmasságát eredményezi (Carr & Morrison, 1984.) és ez a változás EPR mérésekkel nyomon követhető (Butterfield *et al.*, 1994, Mason *et al.*, 1977.).

3 Célkitűzések

Az endotoxinok szerkezete és funkciója közötti kapcsolat leírására a következő célokat tűztük ki.

1. Különböző enterobaktériumok (*E. coli*, *Salmonella*, *Proteus* nemzetségek valamint *Shigella sonnei* mutánsok) lipopoliszacharid molekuláinak szerkezeti jellemzésére és a komponensek mennyiségi- és molekulatömeg meghatározására **mikrochip elektroforézis** módszer kifejlesztése. Gram-negatív baktériumok heterogén S-endotoxinjainak móltömeg szerinti elválasztása, az endotoxin molekula keverék komponenseinek mennyiségi meghatározása, valamint szerkezeti típus szerinti osztályozás kialakítása. Elektroforézis és tömegspektrometria alkalmazása.

2. A továbbfejlesztett mikrochip-elektroforetikus elválasztás alkalmazása különböző (*E. coli*, *Salmonella* genus, *Proteus* genus) enterobaktériumokból származó LPS molekulák nagy érzékenységgel és gyorsasággal való kimutatására teljes sejt-lizátumokból, valamint degradált poliszacharidok kimutatására.

3. Rendszertanilag távol álló, de szerológiailag keresztreakciót mutató baktériumok (*P. morganii* O34 (8662/64), *E. coli* O111 és *S. enterica sv. Adelaide* O35) endotoxinjainak szerkezeti elemzése, a szerológiai keresztkapcsolat hátterének megvilágítása immunológiai és tömegspektrometriás vizsgálatokkal a feltehetően kolitózt tartalmazó lipopoliszacharidok esetén.

4. Kapilláris zónaelektroforézis módszer kidolgozása biomolekulák/endotoxinok detektálására és elválasztására mikrochipen.

5. Az endotoxinok humán vörösvértest membránjára gyakorolt hatásának vizsgálata mikrochip elektroforézis módszerrel és EPR spin-jelöléssel.

4 Anyagok és módszerek

4.1 Felhasznált anyagok

Steril „PBS” oldat (NaCl 8,0 g/L, KCl 0,2 g/L, KH_2PO_4 0,2 g/L, Na_2HPO_4 2,9 g/L). Lizozim és proteináz K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), DTT (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Németország). Monoszacharid standardok: D-ribóz, D-mannóz, D-glükóz, D-galaktóz, inozitol, D-glükózamin, D-galaktózamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Cy5 Mono-Reactive Dye (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), FITC (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Switzerland), glicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

4.2 Felhasznált baktériumtörzsek

A vizsgálatainkhoz használt baktériumtörzsek a következők voltak: *E. coli* O21, O55, O83, O111, O112, O157, ATCC 25922, D31, *S. enterica sv. Adelaide* O35, *S. enterica sv. Minnesota* vadtípus, R595, *S. enterica sv. Urbana* O30, *P. morganii* O34, 352, 1594, *P. penneri* 101, 102, 103, 104, 105, *Shigella sonnei* 4303 (fázis II), 41, és *Shigella flexneri* 5.

4.3 Baktériumtenyésztés

Az általunk vizsgált törzseket Müller-Hinton agarra [Beef extract 300,0 g/l, kazein 17,5 g/l, keményítő 1,5 g/l (OXOID Ltd, UK) + 2 % agar] szélesztettük és 37°C-on 2 napig inkubáltuk. Ezt követően még kétszer átoltottuk, majd 2 ml Müller-Hinton tápoldatban [Beef extract 300,0 g/l, kazein 17,5 g/l, keményítő 1,5 g/l (OXOID Ltd, UK)] rázatott tenyészetet készítettünk, amelyet 37°C-on tartottunk két éjszakán át. A mintákat a rázatást követően azonnal feldolgoztuk (Kustos *et al.*, 1998.).

A baktériumtenyésztést Müller-Hinton táptalajban végeztük Biostat U 30 típusú fermentorban (Braun Melsungen, Melsungen, Németország) 37°C-on. Az előzőleg egy órán keresztül 121°C-on sterilizált táptalajt, két liter, rázótermosztátban (New Brunswick PsycroTherm, Champaign, IL, USA) termelt előtenyészettel oltottuk be. A tenyészetet 37°C-on 25 l/perc levegő befújása mellett 200/perc fordulattal kevertük. A pH-t a fermentor folyamatos

ellenőrzése és 10 N NaOH korrigálás segítségével állandó értéken tartotta (pH 7,2). A habzás fékezésére automatikus adagolással szilikon olajat alkalmaztunk. A termelést tíz óra inkubáció után a logaritmikus fázis végén állítottuk le. A növekedést lemezöntéses csíraszámlálással, illetve 600 nm hullámhosszon Perkin Elmer (USA) fotométerrel ellenőriztük. A tenyészetet 4°C-ra hűtöttük, 100 ml koncentrált formalin hozzáadásával elöltük és átfolyós centrifugán (Zuglói Gépgyár, FS-45, Magyarország) perisztaltikus pumpa segítségével centrifugáltuk. Az így nyert, *kb*. 700 g nedves baktériumot acetonnal szárítottuk. Az intracelluláris vizet is eltávolítva finom szürkésfehér port kaptunk.

4.4 Endotoxinok, lipid A, O-antigének

Az endotoxinok kivonása (tisztítása) az S-típusú baktériumokból **fenol-vizes (1:1/v:v) módszerrel** (Westphal *et al.*, 1952.), míg az R-típusú baktériumokból **fenol-kloform-petroléteres (2:5:8/v:v:v) eljárással** (Galanos *et al.*, 1969.), az endotoxinok lipid A, illetve O-antigén alkotórészeinek elválasztása Kumada és *mtsai.* által kidolgozott metodika szerint történt (Kumada *et al.*, 1989.).

4.5 Oszlopkromatográfia

Az LPS-ket 1% (v/v) ecetsavval 100°C-on 90 percig hidrolizáltuk, felbontva így a lipid A és poliszacharid egység közötti glikozidos kötést. A lipid A-tól leválasztott poliszacharidot (felülúszó) centrifugálás (8000 x g fordulaton 20 percig 4°C-on) után oszlopkromatográfiás eljárással (2,5x80 cm hosszú Sephadex G-50 oszlop) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) tisztítottuk, frakcionáltuk. A szétválasztáshoz piridin-ecetsav puffert (4 ml piridin és 10 ml *cc*. ecetsav 1000 ml vízben) használtunk. Az így nyert degradált poliszacharid (DPS) oldatot Büchi-féle rotációs vákuum bepárló segítségével koncentráltuk, háromszori desztillált vizes oldás és bepárlás segítségével a nyomokban jelenlévő ecetsavat és piridint eltávolítottuk (Haishima *et al.*, 1988, Osborn *et al.*, 1972, Vinogradov, 2002.).

4.6 Endotoxinok kinyerése baktérium sejtlizátumból

A baktériumok tenyésztése (egy homogén telepből) 5 ml Müller-Hinton bouillonban történt (Hitchcock & Brown, 1983, Kocsis *et al.*, 2011b, Makszin *et al.*, 2012.). A tenyészetet 1 éjszakán át 37°C-os rázótermosztátban inkubáltuk.

Ezt követően a baktériumtenyészetből 1 ml-t kivettünk és lecentrifugáltuk (3 perc, 6000 x g). A felülúszót (táptalaj) leöntöttük, az üledéket 1-1 ml desztillált vízzel háromszor mostuk (3 perc, 6000g). Majd a mintákat 100°C-on 30 percig termosztáltuk. A felmelegített szuszpenzióból 200 µl-t kivettünk, hozzáadtunk 4 µl (100 mg/ml) lizozim enzimet. Ezáltal a baktérium peptidoglikán sejtfala felbomlott. Termosztátba raktuk 30 percre 37°C-ra. A baktérium szuszpenzióhoz hozzáadtunk 200 µl lízis puffert (2% (w/v) SDS; 4% (v/v) β-merkaptoetanol; 10% (w/v) glicerol; 1 M Tris-HCl puffer, pH:6,8; 0,05% (w/v) brómfenolkék), ami kiszabadítja a többi sejtalkotót (fehérjéket, endotoxinokat, nukleinsavat és egyéb sejttörmelékeket). 10 percig 100°C-on termosztáltuk. Hozzáadtunk 10 µl (20 mg/ml) proteináz K enzimet és az egészet 3 óráig 65°C-on termosztáltuk. Ezt a lépést még egyszer megismételtük. A proteináz K enzim felbontja és eltávolítja a baktérium sejtfalának fehérjealkotóit. A reakcióelegyhez 800 µl etanolban oldott $MgCl_2$-t adtunk (3,8 mg $MgCl_2^*$ 6 H_2O + 50 ml etanol). A keveréket -20°C-on 1 éjszakán át állni hagytuk. Ez a folyamat állítja le a proteináz K működését és csapja ki az endotoxinokat.

Másnap a mintát lecentrifugáltuk (15 perc, 13000g). A felülúszót (etanolos $MgCl_2$ + proteináz K) leöntöttük, az üledék tartalmazza az endotoxinokat, amit hígítottunk 30 µl PBS-el. A mintákat 5 percig ultrahangos fürdőbe helyeztük. Ezt a fehérjementes LPS tartalmú mintát használtuk fel a további mérésekhez.

4.7 Mikrochip gélelektroforézis módszerfejlesztés

A mikrochip elektroforézis méréshez High Sensitivity Protein 250 LabChip kitet használtunk (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). A kit tartalmazza a mikrochipeket és az alábbi reagenseket: High Sensitivity Protein 250 fluoreszcens festék, dimetil szulfoxid (DMSO), etanolamin, Standard Labeling Buffer (10x SLB, 300mM Tris/HCl, pH>8,5), gél-mátrix (4,5% poli-dimetil-akrilamid alapú lineáris polimer oldat), festékmentesítő oldat (Destaining Solution, DS), és SDS-t tartalmazó mintapuffer oldat (pontos összetétel nem ismert).

A fluoreszcens festék törzsoldat készítése 54 µl DMSO hozzáadásával történt. A minták festéséhez ezt a törzsoldatot tízszeresen hígítottuk (2 µl festékoldathoz adtunk 18 µl desztillált vizet).

Az endotoxinok vizsgálata során a fehérje analízishez javasolt protokolt vettük alapul. Mivel a fehérjék és az endotoxinok felépítése alapvetően eltér egymástól, így a denaturáló oldat helyett hígított SDS mintapuffer oldatot használtunk. A fehérjékkel ellentétben az LPS-t nem denaturálni kell, hanem az aggregátumképződést kell meggátolni. Vizes közegben a zsírsavak számától függően hidrofób lipid A és a hozzácsatlakozó különböző hosszúságú hidrofil cukorlánc változatos térbeli elrendeződését az SDS uniformizálja.

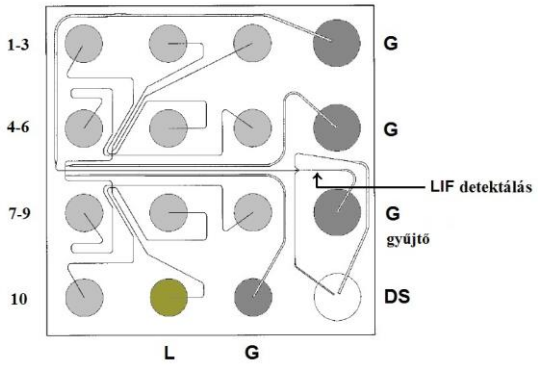
A mikrochip elektroforetikus futtatásokat Agilent Bioanalyzer 2100 típusú készülékkel végeztük lézerindukált fluoreszcencia detektort (630 gerjesztési és 650 nm elnyelési hullámhosszakat) alkalmazva. A rendszer működése a kapilláris gélelektroforézis elvén alapul. A 13 µm mély és 36 µm széles kapillárisok egy üveg chipbe vannak maratva. Ezek a chipek 11 minta vizsgálatára alkalmasak, a mérés időigénye 25 perc egyetlen elválasztó csatorna használatával.

A tisztított és sejtlizátumból származó endotoxinokat fiziológiás sóoldatban oldottuk, majd tízszeres hígítást végeztünk Tris/HCl pufferrel (pH: 8,5), beállítva a minták pH-ját 8 és 9 közé.

A fluoreszcens jelölés során 0,5 µl tízszeresen hígított fluoreszcens festékoldatot adtunk 5 µl mintához, majd az oldatot tíz percig inkubáltuk sötétben, szobahőmérsékleten. A fluoreszcens festék nagy valószínűséggel az endotoxinok lipid A és/vagy core részén lévő szabad nitrogénjéhez kötődik 1:1 arányban. A reakciót 0,5 µl etanolamin hozzáadásával állítottuk le a felesleges festéket megkötve (ez a festék+etanolamin komplex adja minden mintánál a rendszercsúcsot, ami belső standardnak tekinthető). A fluoreszcensen jelölt mintákat ötszörösére hígítottuk 24 µl desztillált víz hozzáadásával. A hígított minták 4 µl-éhez 2 µl SDS mintapuffer oldatot adtunk, majd az oldatot 100°C-on 5 percig inkubáltuk. A lecentrifugált minták felülúszóit használtuk elektroforetikus analízisre.

A chip csatornáit 90 másodpercig hidrodinamikusan töltöttük fel 12 µl szeparáló géllel (poli-dimetil-akrilamid alapú lineáris polimer oldat), mely lecsökkenti az elektroozmootikus áramlást (EOF-t), ezért használhatunk nem bevont kapillárisokat. Ezután 12 µl *ún.* festékmentesítő (destaining) oldatot töltöttünk a „DS” jelű helyre, mely a detektálási pont előtt kihígítja a mintát és a nem kötődött festék oldatot, ezáltal csökken a háttérzaj. A

mintabemérő helyeket és a molekulatömeg standard bemérő helyeit feltöltöttük 6 µl kovalensen jelölt endotoxin mintákkal. (**9. ábra**)



9. ábra Az Agilent Protein elektroforetikus mikrochip felépítése (Bousse *et al.*, 2001.)

Az endotoxin minták futtatásához a Bioanalyzer 2100 program a következőképpen került átdolgozásra: az injektálás elektroforetikusan történt 1000 V-on 80 másodpercig (az injektált mennyiség *kb*. 40 pikoliter). Az elválasztást 1000 V-on végeztük 60 illetve 90 másodpercig, a komponensek az anód (pozitív pólus) felé vándoroltak; a rendszer hőmérsékletét 30ºC-ra állítottuk be. A mintákhoz nem kötődött fluoreszcens festék a detektálási pont előtt pufferrel hígul. Az elektroferogramok minőségi és mennyiségi kiértékelését a 2100 Expert szoftver segítségével végeztük el. A készülék az elektroferogramok mellett automatikusan generál egy analóg gél-képet is. A vándorlási időket a „*Don't analyze*" adatokból határoztuk meg, amit excel-be exportáltunk. „*Don't analyze*" módban sem az időkorrekció, sem a molekulatömeg számítására alkalmas korrekciók matematikai lépései nem történnek meg (melyek a fehérje-molekulatömeg meghatározásra lettek kidolgozva), hanem az elektroferogramot egyszerűen ábrázolja az idő *vs*. jelnagyság diagramon. A csúcs alatti területeket manuálisan integráltuk ki. A mintákat háromszor mértük le ugyanazon és/vagy különböző mikrochipeken, ellenőrizve a mérések ismételhetőségét illetve a csúcspozíció, csúcsszámok és csúcs alatti területek reprodukálhatóságát.

A kimutatási határt a legnagyobb mennyiségben jelenlevő endotoxin komponenst megjelenítő csúcs adatai alapján számoltuk, úgy, hogy a jelintenzitás háromszorosa legyen a háttérzaj szórásának.

4.8 MALDI-TOF tömegspektrometria

1 mg LPS-mintát 1 ml 0,1 M-os citromsav oldatba szuszpendáltunk (a kétértékű kationok megkötése végett), majd a szuszpenziót 10 másodpercre ultrahangos kádba helyeztük. Az oldat néhány mikroliterét Dowex 50WX8-200 (NH_4^+) kationcserélő gyantán sótalanítottuk (az egyértékű kationok eltávolítása végett). A minta felviteléhez "dried-droplet" módszert alkalmaztunk, ami annyit jelent, hogy a mátrixszal 1:1 arányban összekevert mintacseppet hagytuk megszáradni/együttkristályosodni a MALDI mintatartón. Mátrixnak a 2,5-dihidroxi-benzoesav telített citromsavas oldatát használtunk. A minták tömegspektrometriás analízisét Bruker Autoflex II. MALDI-TOF/TOF MS (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA) tömegspektrométeren végeztük lineár módban. Az LPS ionokat negatív ionizációs módban detektáltuk *m/z* 1000–20000 tömegtartományban. A készülék külső kalibrálása standard peptidek felhasználásával történt. Az adatok kiértékelését a Flex Analysis software (2.4-es verzió) segítségével végeztük el. A tömegspektrumok kiértékelését az endotoxinok szerkezetét felépítő cukor, foszfát és zsírsav átlagos molekulatömegeinek összegzésével adtuk meg. A tömegspektrumban megjelenő $[M-H]^-$ kvázimolekula ionokhoz hozzárendeltük az elemi összetételt.

4.9 Mikrochip zónaelektroforézis módszer kidolgozása

A mikrochip zónaelektroforetikus futtatásokat is Agilent Bioanalyzer 2100 típusú készülékkel hajtottuk végre, lézerindukált fluoreszcens detektort alkalmazva: kék lézerrel 470 nm-en gerjesztve és 525 nm-es emissziót mérve, valamint vörös lézerrel 630 nm-en gerjesztve és 650 nm-es emissziót mérve. A FITC festékkel jelölt minták abszorpciós tartományába esik a kék lézer emissziós hullámhossza, míg a vörös lézerrel a Cy5 fluoreszcens festékkel jelölt molekulák gerjeszthetők.

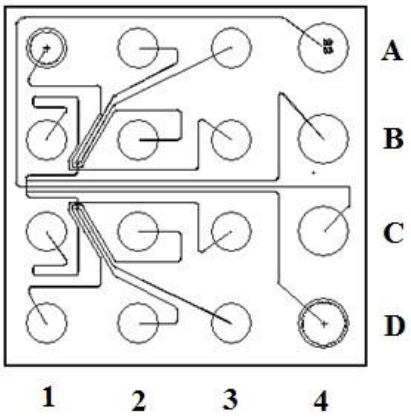
Az elektroforetikus futtatásokhoz a mintákat a kereskedelmi forgalomban kapható Agilent RNS chipeken vizsgáltuk. Ezek a chipek 12 minta vizsgálatára alkalmasak, a mérés időigénye 30 perc egyetlen elválasztó csatorna használatával.

A futtató és mintapuffer 4 mM SDS-t tartalmazó 100 mM koncentrációjú borát puffer (pH:8,3) volt. A puffer kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy ne tartalmazzon primer amino csoportot (Tris, glicin), ami egyaránt jelölődik fluoreszcens festékkel, illetve a pH-ja 8-9 között legyen, mely optimális körülmény a hatásos jelöléshez. Mintaként különböző

koncentrációban Cy5 (792 Da) és FITC (389,4 Da) festékek ill. FITC fluoreszcens festékekkel jelölt glicin és Cy5 fluoreszcens festékkel jelölt *E. coli* O83, *E. coli* O111 és *S. enterica sv. Minnesota* R595 baktériumokból származó endotoxinok voltak.

Az endotoxin minták fluoreszcens jelöléséhez 0,5 µl 25 mM Cy5 és FITC törzsoldatokat használtunk DMSO-ban feloldva. Az Cy5 festékkel való jelölés tíz percig, míg a FITC festékkel való jelölés 24 órai inkubációval történt sötétben, szobahőmérsékleten. A lecentrifugált minták felülúszóit használtuk az elektroforetikus analízishez.

A chip feltöltése az RNS chipekhez beállított chip-feltöltő állvánnyal történt. Az RNS metodikában (Agilent, 2013.) szereplő 9 µl helyett 12 µl 4 mM SDS-t tartalmazó 100 mM borát futtató puffert (BGE) pipettáztunk a C4 (outlet) mélyedésbe, majd a chip csatornáit 20 másodpercig (30 s helyett) hidrodinamikusan feltöltöttük *kb.* 4 bar nyomással, a puffer tulajdonságai miatt.



10. ábra RNS-chip elrendezése (Lu *et al.*, 2002.)

Ezután a többi A4 (inlet) és B4 (gyűjtő tartály) helyekre is 12 µl BGE oldatot pipettáztunk, majd a molekulatömeg standard bemérő helyre (D4) 12 µl 10 nM Cy5 festéket tartalmazó BGE puffer oldat került a detektor beállítása végett. Minden mintából 6 µl-t tettünk a maradék 12 mintabemérő helyre (A1-D3) (**10. ábra**).

A chip mérés előtt a készülék elektródjait 350 µl desztillált vizet tartalmazó elektródtisztító chippel tisztítottuk. A minták futtatásához az eredeti RNS méréshez tartozó script átdolgozásra került. A script a chip mérés folyamán az egyes műveleti lépéseket (hőmérséklet beállítás, lézerek fókuszálása, injektálás, elválasztás) és beállításait (injektálási-, elválasztási

idő és feszültség, hőmérséklet, lézer) tartalmazza. A változtatások a következők voltak: elektroforetikus injektálás 1300 V-on (1400 V helyett) 45 másodpercig (9 s helyett); elválasztás 800 V-on (900 V helyett) (*kb*. 19 kV/m) 120 illetve 160 másodpercig (70 s helyett), melyet optimalizálással állapítottunk meg; a komponensek a katód (negatív pólus) felé vándoroltak (polaritáscsere, zónaelektroforézis miatt); a rendszer hőmérsékletét 30°C-ra állítottuk be. Az elválasztás elektroozmózis jelenlétében történt.

A mintákat háromszor mértük le ugyanazon és/vagy különböző chipek-en, ellenőrizve a mérések ismételhetőségét. Agilent 2100 Expert szoftver segítségével gyűjtöttük és elemeztük az adatokat.

4.10 Antitest termelés

Az immunizáláshoz használt baktériumokat 37°C hőmérsékleten, egy éjszakán keresztül ferde agaron tenyésztettük. Mosás után fiziológiás sóoldatba szuszpendáltuk, hogy a koncentrációja 10^8 cfu/ml legyen. A baktérium szuszpenziót 100°C fokon, egy órán át főztük (hővel kezelt baktérium szuszpenzió). Az új-zélandi nyulakat (átlagos testtömeg 3 kg) intravénásan: 0,2 ml (0. napon), 0,4 ml (5. napon), 0,8 ml (10. napon), 1,2 ml (15. napon), 1,6 ml (20. napon), 1,8 ml (25. napon) immunizáltuk.

Az utolsó injekció előtt próbavért vettünk és annak titerét csőagglutinációval határoztuk meg. Az 1:3200, 1:6400 hígítást tartottuk elfogadhatónak. Ha nem volt ilyen magas a titer, akkor tovább immunizáltunk. Az utolsó injekció után *kb*. 14 nappal, a nyulakat elvéreztettük. A vért steril üvegedénybe gyűjtöttük. A kapott vért egy órán át 30°C-on, majd további *kb*. 10 órán át 4°C-on tartottuk, hogy a véralvadás teljes legyen. Ezután Janetzki K-70-es centrifugán 4°C–on, 15 percig, 2000-es fordulattal centrifugáltuk. A savót leszívtuk és Seitz szűrőn sterilre szűrtük, majd steril műanyag edényekben –20°C-on tároltuk (Péterfi & Kocsis, 2000.).

4.11 ELISA

Immunológiai keresztreakciók igazolására ELISA teszteket alkalmaztunk. A tesztek baktériumokból származó intakt LPS, vagy DPS vagy lipid A minták és nyúlban előállított immunszérum közötti szerológiai reakción alapulnak: kezeletlen és hővel elölt baktérium által kimerített antiszérummal dolgoztunk. A keresztreakciót kecskében termelt anti-nyúl-IgG-hez

kötött o-fenilén diamin peroxidáz szubsztráttal mutattuk ki. Az optikai denzitást 492 nm-en mértük (Titertek Uniscan reader, Flow Laboratories, Helsinki, Finland).

Vizsgálatot végeztünk **P** (*P. morganii* O34 endotoxinok ellen termelt), **E** (*E. coli* O111 endotoxinok ellen termelt) és **S** (*S. enterica sv. Adelaide* O35 endotoxinok ellen termelt) immunsavókkal, mint kontrollokkal. Az immunsavókat felhasználtuk antitest kimerítéses mérésekhez, amely során a háromféle törzshöz tartozó, hővel elölt *P. morganii* O34 (*P*), *E. coli* O111 (*E*), illetve *S. enterica sv. Adelaide* O35 (*S*) baktériumokkal inkubáltuk (egy éjszakán át, 4°C) a savókat, és így jutottunk a **P**-*P*, **E**-*P*, **S**-*P* jelölésű, a **P**-*E*, **E**-*E*, **S**-*E* jelölésű, és a **P**-*S*, **E**-*S*, **S**-*S* jelölésű („kimerített") savókhoz centrifugálást (6000 x g, 20 perc) követően (felülúszó). Az üledék tartalmazta a baktériumsejtekhez kötött antitesteket.

4.12 Gázkromatográfia – tömegspektrometria

A gázkromatográfiás méréshez a vizsgálandó LPS cukor-összetevőket alditol acetáttá alakítottuk a Sawardeker és Sloneker által kidolgozott metodika szerint (Sawardeker & Sloneker, 1965.).

A DPS mintákat 1 M H_2SO_4-val hidrolizáltuk 100°C-on, 14 órán keresztül. A hidrolizátumot bárium-hidroxiddal semlegesítettük. Na-bórhidrides (13 mg Na-bórhidrid 1 ml desztillált vízben) redukálást követően a felesleges bórhidridet 50 µl koncentrált ecetsav hozzáadásával kötöttük le. Desztillált metanolos bepárlással a borátot eltávolítottuk. A bepárlást követően a minták így már redukált cukrokat tartalmaztak. 14 órán keresztül 100°C-on ecetsavanhidrid segítségével acetiláltuk, majd desztillált vizes mosás és bepárlás után 1 ml kloroformban oldottuk a cukor származékokat.

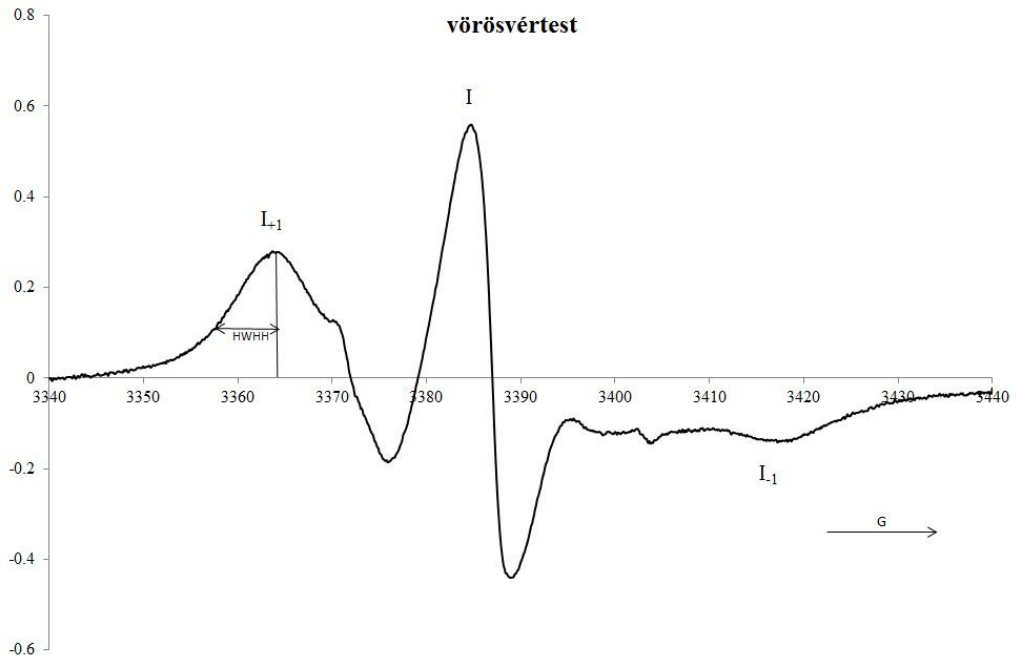
A GC-MS készülék (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) egy gázkromatográfból (6890N) és egy quadrupole tömegspektrométerből (5975) állt. Az elválasztás DB-225 kapilláris oszlopon [(Agilent Technologies, Waldbronn, Németország), hossz: 30 m, belső átmérő: 0,25 mm, film rétegvastagság: 0,15 µm] történt. A vivőgáz 1,5 ml/perc sebességgel 21 psi nyomáson áramoltatott, nagy tisztaságú hélium volt. Az injektált mennyiség 1 µl volt, split injektálást alkalmazva. GC hőmérsékleti programot használtunk, 180°C kezdő hőmérsékletet emeltük percenként 5°C/perccel 235°C-ig (41,5 perc). Az injektor hőmérséklete 200°C, a detektoré 300°C és az ionforrásé 230°C volt. Az ionizációs feszültség 70 eV elektron ütköztetéses (EI) módban, a detektált tömegtartomány pedig 20-600 amu.

A különböző baktériumokból származó monoszacharidokat MS-könyvtár segítségével és ismert standardok hozzáadásával azonosítottuk. Belső standardként ismert koncentrációjú meso-inozitolt kevertünk mintáinkhoz.

4.13 Endotoxinok kölcsönhatásának vizsgálata MGE és EPR módszerekkel

Az endotoxinok hemoglobinnal való kölcsönhatását mikrochip gélelektroforézissel vizsgáltuk. 1 mg/ml hemoglobint (Sigma-Aldrich) 20 percig kezeltünk 2 mg/ml *E. coli* O83 baktériumból származó tisztított endotoxinokkal, 1:1 arányban.

A vörösvértest membránnal való kölcsönhatást EPR mérésekkel követtük nyomon. A minták előkészítése a következő módon történt. 1 ml humán, EDTA-val alvadásgátolt vért különböző koncentrációjú (200 µg/ml, 100 µg/ml és 10 µg/ml) *E. coli* O83-ból és és *S. enterica sv. Minnesota* R595-ből izolált endotoxinokkal inkubáltuk (4°C, 90 perc), majd centrifugálással a plazmát leválasztottuk. A vörösvértest minták spinjelölését 1,5 mg/ml 5-SASL [5-(4',4-dimetil-oxazolidin-N-oxil) sztearinsav] oldattal végeztük. Az EPR spektrumokat ESP 300E spektrométerrel (Bruker BioSpin, Karlsruhe, Németország) vettük fel. A minta elhelyezése után a spektrum felvétele a következő paraméterek mellett történt: a mikrohullámú teljesítmény 20 mW, a modulációs amplitúdó 2,0 G, a mágneses térerősség *kb.* 3480 G, a pásztázott tértartomány 100 G, az időállandó 5,12 ms, a konverziós idő 2,56 ms volt. Általában 5–10 spektrumot átlagoltunk. A kiértékelésnél a félértékszélesség (*half-width at half-height,* HWHH) (Mason *et al.,* 1977.) meghatározása bizonyult a legmegfelelőbbnek, melyet a spektrum alacsonyterű szélsőértékénél vettünk figyelembe. A HWHH érték meghatározását lásd a **11. ábrá**n. Ennek csökkenése a membrán-fluiditás csökkenését mutatja.



11. ábra Félértékszélesség meghatározása a spektrum alacsonyterű (I_{+1}) szélső értékénél az 5-SASL-al jelölt vörösvértest plazmamembránjában (Mason *et al.*, 1977.).

5 Eredmények

5.1 Mikrochip gélelektroforézis módszerfejlesztés lipopoliszacharidok szerkezeti jellemzésére

Munkám során új mikrochip gélelektroforézis technikát fejlesztettünk ki, amelyben a mintaelőkészítés során alkalmazott fluoreszcens festék kovalensen kapcsolódik az LPS molekulákhoz, feltehetően az LPS lipid A, illetve core – O-oldallánc régiójában található szabad amino csoport(ok)hoz (Makszin *et al.*, 2012.). Módszerünket az eredetileg fehérjék vizsgálatára tervezett *High Sensitivity Protein 250 LabChip* kit rendszer (Agilent, 2008.) elválasztási körülményeinek átdolgozásával fejlesztettük ki. Ennek során a következő paramétereket optimalizáltuk: (i) fluoreszcens festék megfelelő arányú hígítása (ii) festési körülmények változtatása (inkubációs idő, hőmérséklet) (iii) fluoreszcens festék-endotoxin komplexek megfelelő arányú hígítása (iv) detektálási idő optimalizálása.

Az elválasztás során a fluoreszcens festékkel jelölt kivonat endotoxin - keverék komponensei egy poli-dimetil-akrilamid alapú gélben különülnek el egymástól, a bennük található core oligoszacharid és O-oldallánc jelenlétének és hosszúságának függvényében. Módszerünkkel egymás után egy futtatásban 11 endotoxin minta vizsgálható nagy hatékonysággal és felbontással, fél órán belül.

5.1.1 Szerkezeti típus szerinti osztályozás

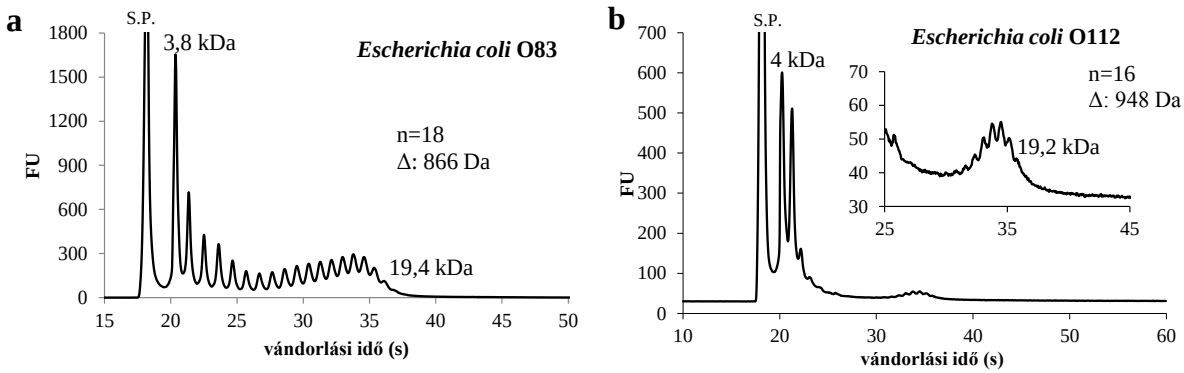
Az *Enterobacteriaceae* család különböző baktériumtörzseiből izolált 19 S- és 4 R-típusú endotoxin-mintát vizsgáltam. A fluoreszcensen jelölt endotoxinok elektroferogramjainak profilja a baktériumtörzseknek megfelelő, jellegzetes képet mutattak. Az R-típusú endotoxin kivonatok keverékében egy vagy két féle endotoxin elkülönülése, míg az S-típusú endotoxin kivonatoknál 2-40 féle endotoxin szétválasztása is látható volt.

Az S-típusú, *E. coli*, *Proteus*, *Shigella* és *Salmonella* baktérium nemzetségekből származó, fluoreszcens festékkel jelölt endotoxin kivonat komponenseinek elektroforetikus profiljai a **12-15. ábrá**n láthatók. A molekulaméret alapján történő elválasztás az aggregálódás megakadályozása során felhasznált SDS-nek köszönhető. Az elektroferogramokon a fluoreszcencia intenzitás a vándorlási idő függvényében van ábrázolva.

Az elektroferogramokon a különböző számú csúcsok megfeleltethetők az endotoxin molekulában levő O-poliszacharid lánc ismétlődő egységeinek, ahol a rendszercsúcs utáni első csúcs a lipid A és core oligoszacharid egységekből felépülő endotoxin komponens, a további csúcsok a rendre növekvő számú O-poliszacharid ismétlődő egységet tartalmazó endotoxin komponenseknek felelnek meg.

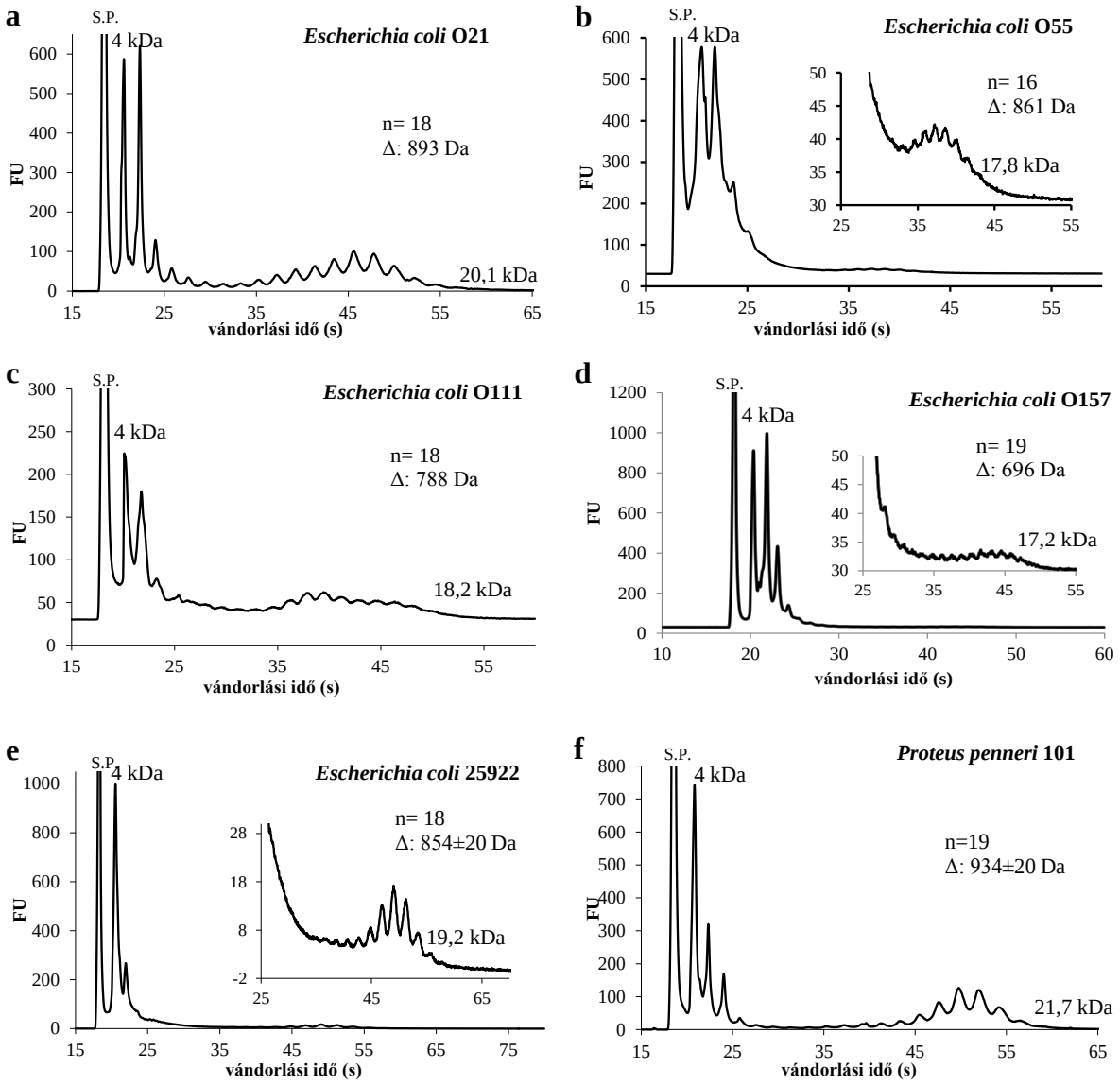
A vándorlási időtartomány és a komponensek relatív mennyiségének segítségével az S-típusú endotoxinok osztályozására különböző csoportokat hoztunk létre. Ez alapján az *1. csoportba* tartozó endotoxinok jellegzetes, maximumgörbe jellegű mintázatot mutatnak a nagyobb vándorlási időknél. Ezen a csoporton belül tovább osztályozhatjuk az endotoxinokat aszerint, hogy az 1. komponens (lipid A + core) vagy az azt követő, 2. komponens (lipid A + core + 1 ismétlődő egységet tartalmazó O-oldallánc) van-e a legnagyobb mennyiségben jelen, illetve aszerint, hogy az LPS komponensek milyen mozgékonyságúak.

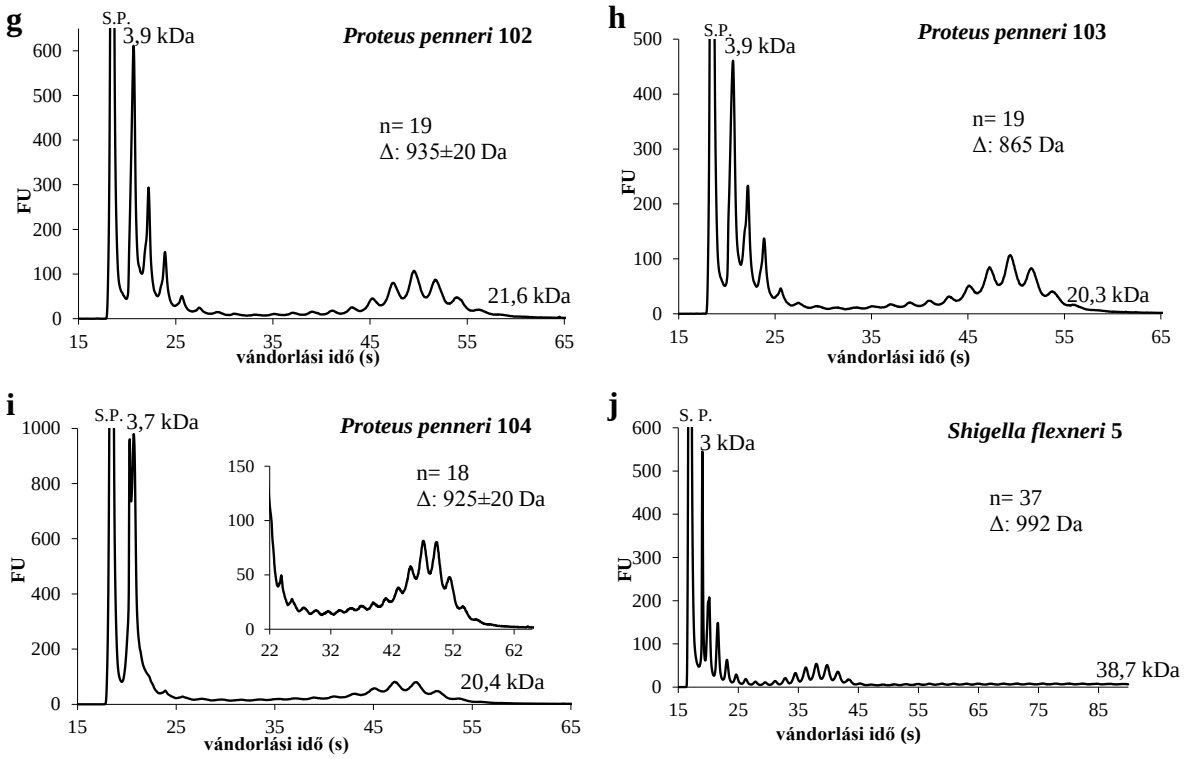
Ezek alapján az *E. coli* O83 és O112 baktériumokból származó endotoxin molekulákat (**12a-b ábrák**) az *1.a csoportba* sorolhatjuk, miszerint az első csúcs (lipid A + core) mennyisége nagyobb az egy ismétlődő egységet tartalmazó komponensnél, és az LPS komponensek vándorlási ideje kisebb, mint 38 s, ami a többi LPS-hez képest relatíve nagy mobilitást jelent. A vándorlási idő megadását természetesen az adott körülményekre kell vonatkoztatni.



12. ábra Az *1.a csoportba* tartozó Gram-negatív baktériumokból származó S-típusú endotoxin kivonat komponenseinek elektroforetikus profiljai: (a) *E. coli* O83, (b) *E. coli* O112. Az első, és az utolsó, azaz a legkevesebb és a legtöbb ismétlődő egységet tartalmazó komponensnek becsült molekulatömegét feltüntettem. Mérési körülmények: kapilláris rendszer: HSP 250 Protein Chip; futtató puffer: poli-dimetil-akrilamid-alapú lineáris polimer oldat pH: 8; gerjesztés 630 nm és fluoreszcencia detektálás 680 nm; injektálás: 80 s, 1000 V; a komponensek az anód felé vándorolnak. A minták koncentrációja a chip bemérő helyeken 0,1 µg/µl. Jelölések: S.P.: system peak (rendszercsúcs), n: ismétlődő egységek száma, Δ: egy ismétlődő egység molekulatömege (Da)

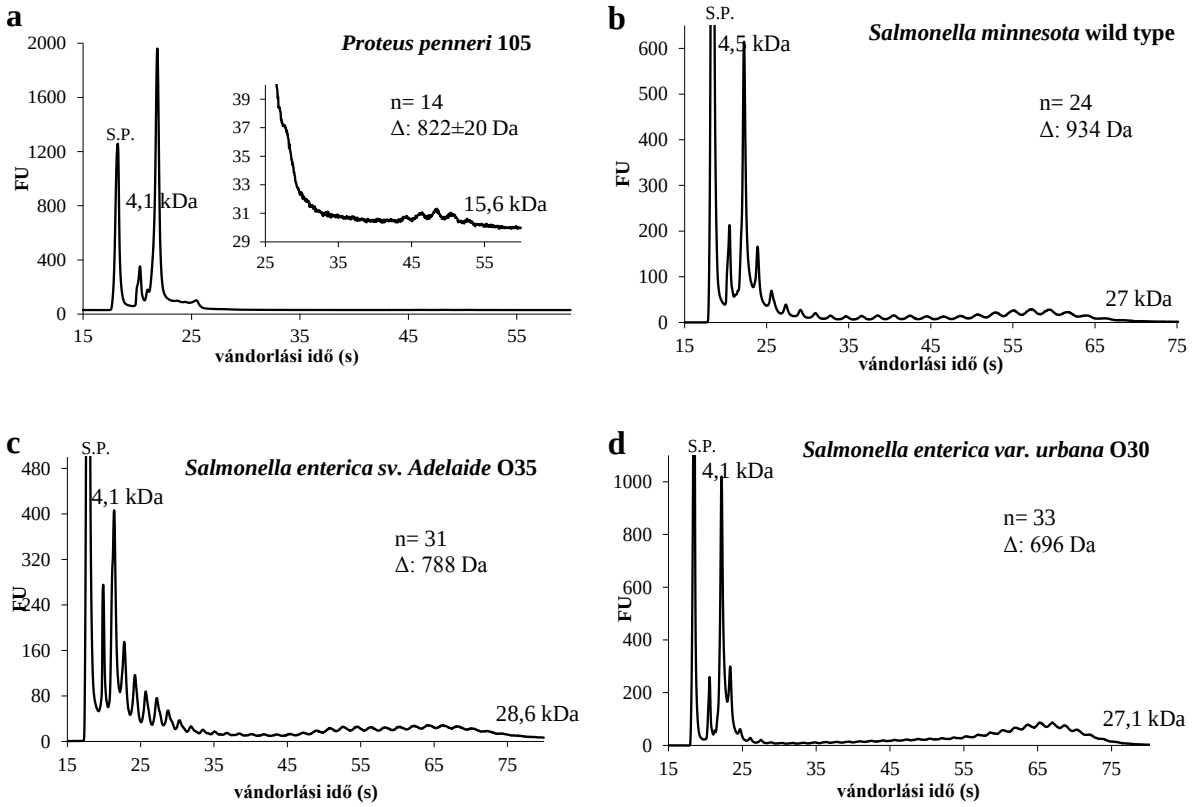
Hasonló a profiljuk az *1.b csoportba* tartozó *E. coli* O21, O55, O111, O157, ATCC 25922, *P. penneri* 101, 102, 103, 104 és *S. flexneri* 5 baktériumokból származó endotoxin komponenseknek (**13a-j ábrák**), azzal a különbséggel, hogy az LPS komponensek vándorlása maximum 58 másodpercet vesz igénybe, ami az *1.a csoportéhoz* képest relatíve lassabb vándorlás.





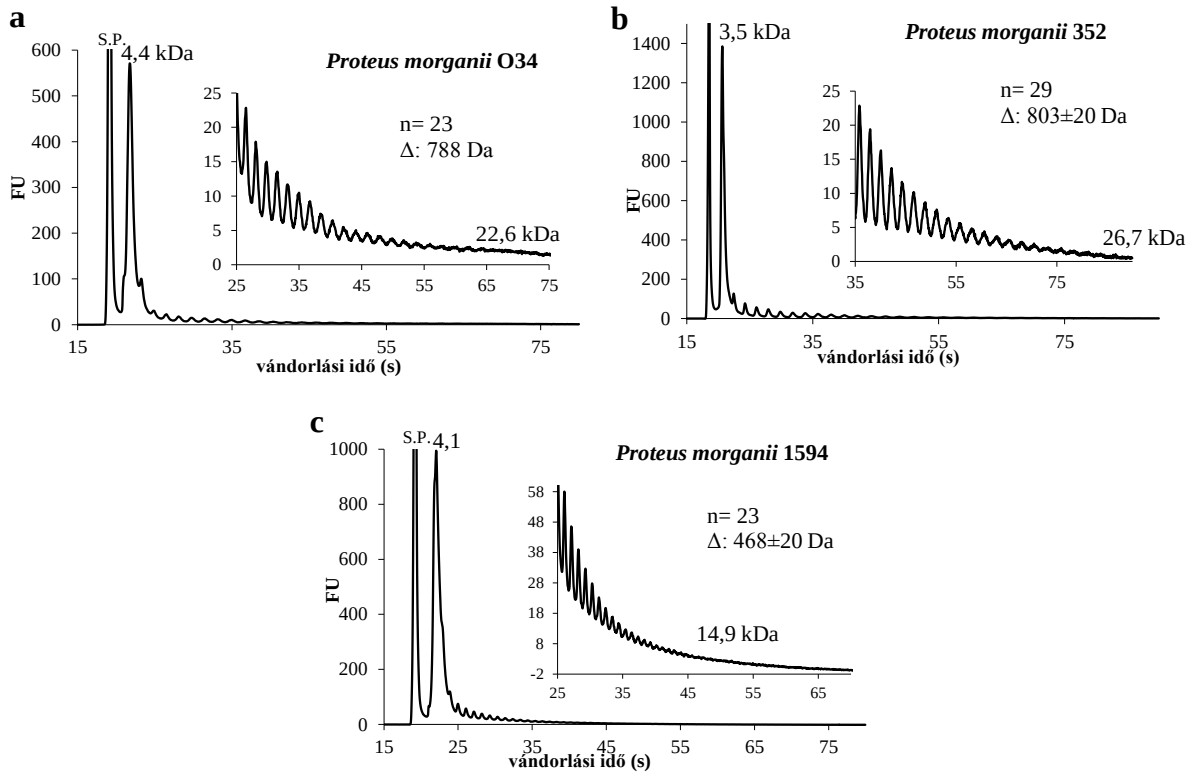
13. ábra Az *1.b csoportba* tartozó Gram-negatív baktériumokból származó S-típusú endotoxin komponensek elektroforetikus profiljai: (a) *E. coli* O21, (b) *E. coli* O55, (c) *E. coli* O111, (d) *E. coli* O157, (e) *E. coli* ATCC 25922, (f) *Proteus penneri* 101, (g) *P. penneri* 102, (h) *P. penneri* 103, (i) *P. penneri* 104, (j) *Shigella flexneri* 5. A mérési körülmények megegyeznek a 12. ábra aláírásában leírtakkal.

Az *1.c csoportba* tartozó *P. penneri* 105, *S. enterica sv. Minnesota* vadtípus, *S. enterica sv. Adelaide* O35 és a *S. enterica sv. Urbana* O30 (**14a-d ábrák**) baktériumokból származó endotoxinoknak a lipid A + core régiót magába foglaló 1. komponens mennyisége jelentősen kisebb a második komponenséhez képest, a legnagyobb LPS komponensek vándorlása maximum 70-75 s között figyelhető meg.



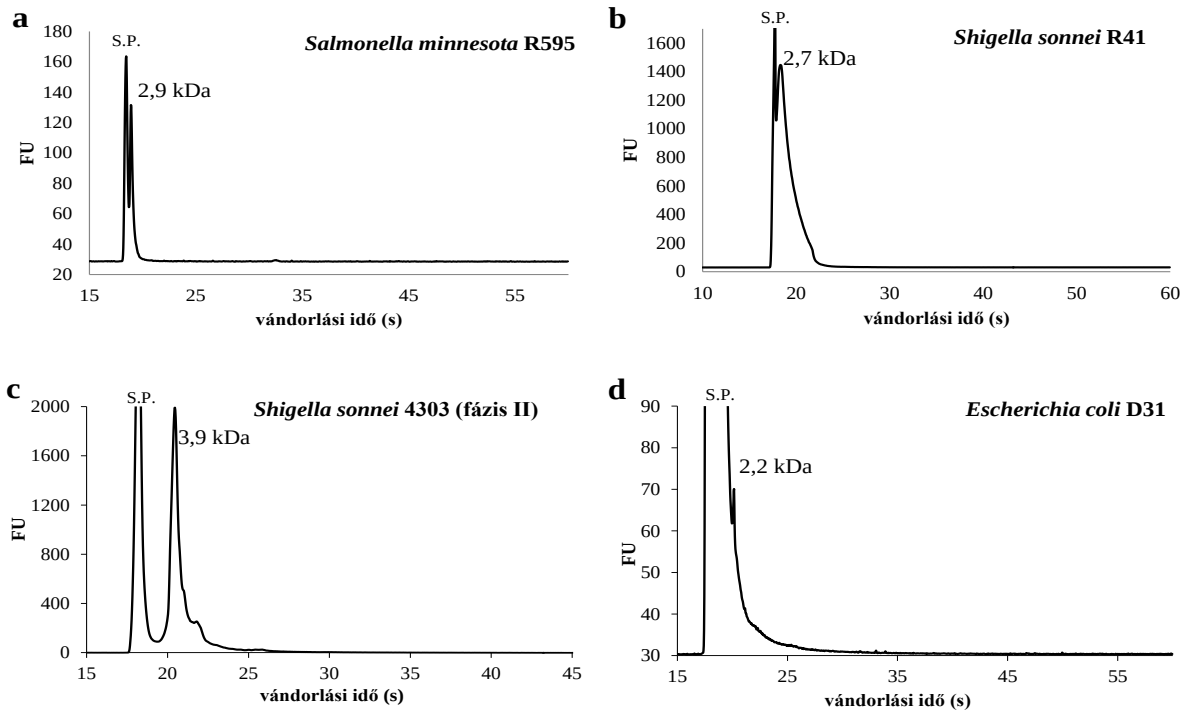
14. ábra Az *1.c csoportba* tartozó Gram-negatív baktériumokból származó S-típusú endotoxin komponensek elektroforetikus profiljai: (a) *P. penneri* 105, (b) *Salmonella enterica sv. Minnesota* vadtípus, (c) *S. enterica sv. Adelaide* O35, (d) *S. enterica sv. Urbana* O30. A mérési körülmények megegyeznek a 12. ábra aláírásában leírtakkal.

A *2. csoportba* tartozó *P. morganii* O34, 352 és 1594 baktériumokból származó endotoxinoknál (**15a-c ábrák**) a komponensek relatív mennyisége folyamatosan csökken a vándorlási idővel (molekulatömeggel, O-oligoszacharid oldallánc méretével).



15. ábra A *2. csoportba* tartozó Gram-negatív baktériumokból származó S-típusú endotoxin komponensek elektroforetikus profiljai: (a) *Proteus morganii* O34, (b) *P. morganii* 352, (c) *P. morganii* 1594. A mérési körülmények megegyeznek a 12. ábra aláírásában leírtakkal.

A **16a-d ábrákon** a tisztított R-típusú *S. enterica sv. Minnesota* R595, *S. sonnei* R41, 4303 (fázis II) és *E. coli* D31 törzsekből származó endotoxinok elektroforetikus profiljai láthatók. Az elektroferogramokon egy vagy két komponens figyelhető meg és az esetek többségében az első komponens átfedésben látható a rendszercsúccsal, ami a komponensek kis molekulatömegének köszönhető. Mivel az R-típusú LPS-ekben nem található O-oldallánc, ezért a mintacsúcs(ok) megfelel(nek) a lipid A + core oligoszacharid egységekből álló intakt LPS komponensnek.



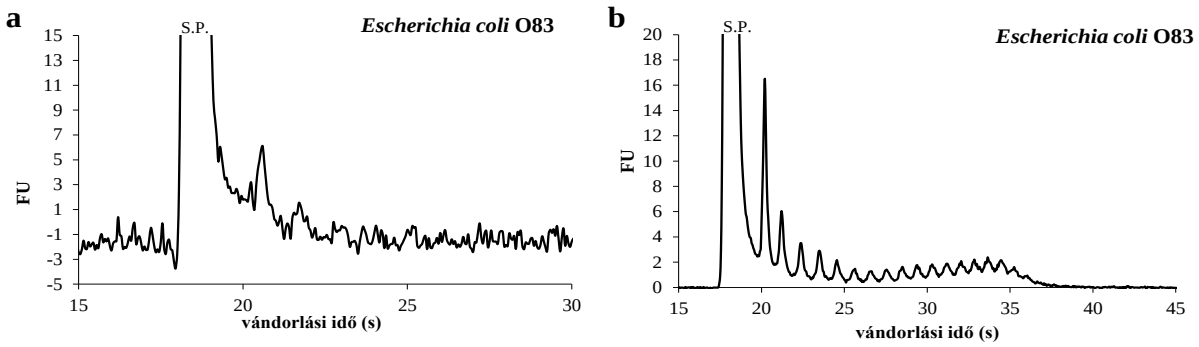
16. ábra Gram-negatív baktériumokból származó R-típusú endotoxinok elektroforetikus profiljai: (a) *Salmonella enterica sv. Minnesota* R595, (b) *Shigella sonnei* R41, (c) *S. sonnei* 4303, (d) *E. coli* D31. A mérési körülmények megegyeznek a 12. ábra aláírásában leírtakkal, kivéve a *Salmonella enterica sv. Minnesota* R595 esetében, ahol a mintahígítás 1:200 volt, 1:10 hígítás helyett. Egy (vagy kettő) komponens látható az R-típusú LPS-eknél. A fő mintacsúcs közvetlen a rendszercsúcs (S.P.) után jelenik meg, egyes esetekben azzal részben átfedve.

Az endotoxin komponensek relatív mennyiségének meghatározását a csúcsok integrálásával végeztük el. Minden elektroferogramban az első mintacsúcshoz referencia értéknek 1000 egységet rendeltünk. Az **1. táblázat** az endotoxin komponensek relatív mennyiségét mutatja be (RSD=10%) a vándorlási idővel korrigált terület-érték megadásával. Az egyes komponenseket számozással, nem a vándorlási idő értékkel adtuk meg, mivel az azonos számmal jelölt csúcsoknak más a molekulatömege, így a vándorlási értékük is eltérő.

Az elektroferogramok vándorlási idejének reprodukálhatósága RSD = 0,8 % az S-típusú LPS komponensek és a rendszercsúcstól elkülönülő R-típusú komponensek esetében. A rendszercsúccsal átfedésben megjelenő R-típusú LPS komponenseknél ez az érték magasabb (RSD = 4,6 %).

Meghatároztuk a kimutatási határt (limit of detection, LOD) a vizsgált tisztított LPS mintáknál. Az S-típusú endotoxinok esetében a kimutatási határ a legnagyobb mennyiségben jelenlévő komponenst tekintve 0,43 ng/µl (**17a ábra**), a legkisebb mennyiségben jelenlévő

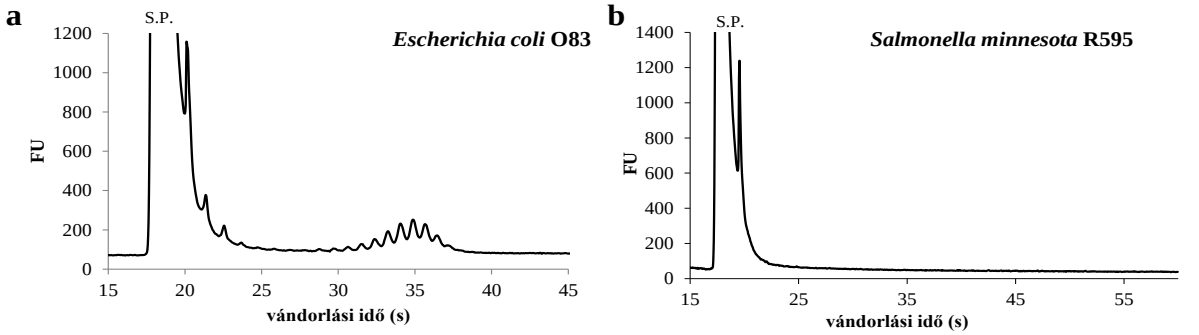
komponenst tekintve 1,01 ng/µl (**17b ábra**). Az egy LPS komponenssel rendelkező R-típusú *S. enterica sv. Minnesota* R595 esetében a kimutatási határ 1,13 ng/µl volt.



17. ábra *E. coli* O83 baktériumból származó tisztított LPS-ek kimutatási határának meghatározásához felhasznált elektroferogramok.

5.1.2 Sejtlizátumok vizsgálata

Baktériumok sejtlizátumából származó, részlegesen tisztított endotoxinokat is sikeresen detektáltunk az általunk kidolgozott mikrochip gélelektroforézis módszerrel. Ezek közül az *E. coli* O83 és *Salmonella enterica sv. Minnesota* R595 endotoxinok elektroferogramjait mutatják be a **18a-b ábrák**. A részlegesen tisztított endotoxinok elektroforetikus profiljai nagy hasonlóságot mutatnak az azonos baktériumtörzsekből izolált, tisztított endotoxinok elektroforetikus profiljával (*ld.* **12a és 16a ábra**). Ez azt igazolja, hogy a baktériumok sejtlizátumaiból nyert fehérjementes LPS minták minden további tisztítás nélkül, közvetlenül vizsgálhatók a kifejlesztett MGE módszerünkkel.



18. ábra Baktérium sejtlizátumából származó, részlegesen tisztított endotoxin kivonat komponenseinek elektroforetikus profiljai: (a) S-típusú *E. coli* O83 és (b) R-típusú *Salmonella enterica* sv. *Minnesota* R595. A mérési körülmények megegyeznek a 12. ábra aláírásában leírtakkal.

1. táblázat S-típusú Gram-negatív baktériumokból származó tisztított endotoxin kivonat komponenseinek relatív mennyiségi meghatározása mikrochip gélelektroforézissel

Csúcsok	*Escherichia coli*							*Proteus penneri*				*Shigella*	*Proteus*	*S. enterica*	*S. enterica*	*S .enterica*	*Proteus morganii*		
	O83	O112	O21	O55	O111	O157	25922	101	102	103	104	5	105	vadtípus	O35	O30	O34	352	1594
1	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
2	413	680	1095	689	929	1073	117	287	335	344	1749	880	7962	3831	2735	5344	22	1158	7
3	272	53	224	60	114	362	2	188	182	223	118	613	193	590	724	710	10	28	12
4	250	13	106	30	57	54	1	27	53	55	79	238	nl	290	585	112	14	35	11
5	168	8	56	nl	33	6	nl	11	22	20	55	110	nl	163	437	64	14	34	9
6	114	9	37	nl	20	3	nl	6	14	16	46	67	nl	115	407	70	14	31	7
7	101	nl	27	nl	32	2	nl	4	8	11	38	44	nl	101	265	27	11	23	6
8	108	nl	29	nl	20	1	2	4	6	9	39	39	nl	69	155	20	10	22	5
9	119	nl	55	nl	24	1	2	8	7	12	36	57	nl	68	95	20	10	22	3
10	126	nl	89	nl	26	1	1	14	15	17	45	90	nl	80	42	25	7	20	3
11	127	3	120	nl	83	2	1	26	21	26	46	157	3	97	33	34	6	16	2
12	121	4	131	3	110	2	2	23	21	29	55	231	6	95	25	36	5	14	2
13	116	8	170	4	**133**	2	3	28	32	39	99	**271**	**7**	97	24	31	3	12	2
14	116	11	228	5	116	2	5	56	62	72	229	260	4	80	27	35	3	10	1
15	**121**	**11**	**238**	**6**	63	2	11	114	143	155	441	170	3	74	25	30	3	8	1
16	107	8	130	5	42	**3**	**18**	**205**	**223**	**242**	**517**	66		89	28	35	3	7	1
17	61	1	47	3	46	2	15	202	77	60	244	17		100	31	28	2	6	1
18	17		25		47	2	6	85	18	14	71	15		148	35	28	2	5	1
19	3		11		30	2	2	22	10	9	22	17		**184**	56	35	2	5	1
20	0					1		13	77	60		16		184	88	43	1	4	0
21												15		172	79	34	1	3	0
22												20		133	**92**	31	1	3	0
23												21		81	77	43	1	2	1
24												18		38	67	54	1	2	0
25												20		12	72	74		1	
26												17			77	98		2	
27												19			81	123		1	
28												19			77	118		1	
29												19			70	162		1	
30												16			35	**193**		1	
31												17			40	181			
32												20			21	145			
33												22				107			
34												16				60			
35												17							
36												16							
37												15							
38												15							

A vastagon jelölt számok a legnagyobb mennyiségben jelenlévő endotoxin komponenseket jelölik az elektroferogram második felében, nl: csúcsok nem láthatók

5.1.3 LPS kivonat komponensek molekulatömegének meghatározása

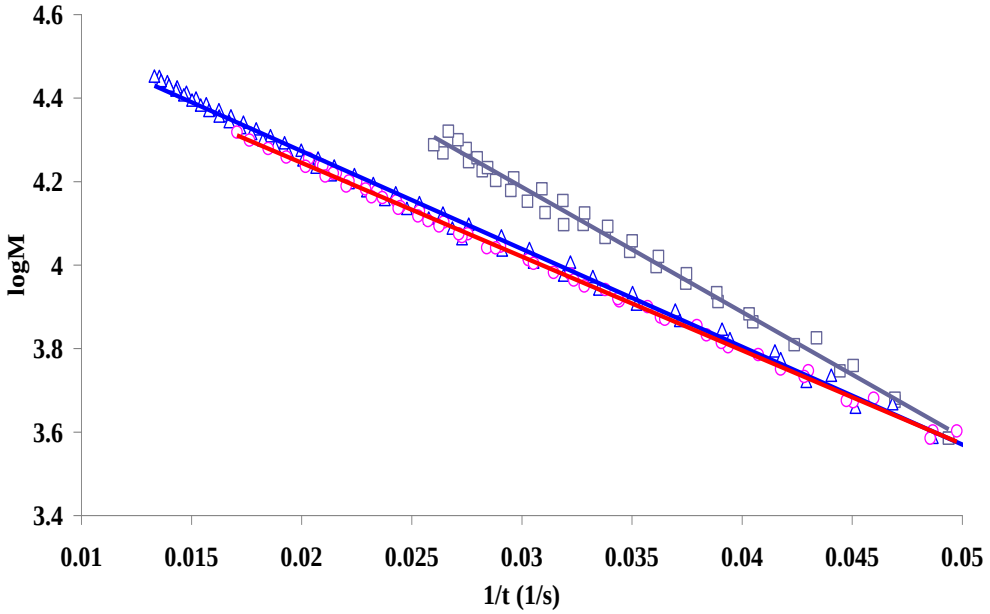
A cukortartalommal rendelkező LPS molekulák más tulajdonságú komponensek SDS jelenlétében, mint a fehérjék, amit a vándorlási idők is jeleznek. Ebből következik, hogy semelyik molekulatömeg standard (fehérje, DNS, RNS), amely a mikrochip technikában használatos, nem alkalmazható az endotoxin komponensek molekulatömegének meghatározásához. Az MS és NMR készülékekkel vizsgált és már publikált, ismert szerkezetű LPS részegységek pontos molekulatömegei viszont hozzárendelhetők a mikrochip futtatáskor kapott LPS komponensekhez (csúcsokhoz). Az általunk vizsgált LPS-eket alkotó lipid A, core és O-poliszacharid ismétlődő egységeinek molekulatömeg adatait a **2. táblázat** foglalja össze.

2. táblázat Irodalomban szereplő endotoxinok alkotóelemeinek molekulatömeg adatai

Baktériumtörzs	**lipid A (Da)**	**core (Da)**	**ismétlődő egység (Da)**
		***S*-típus**	
Escherichia coli O83	**1798** (Silipo *et al.*, 2002.)	**2048** (Ulmer *et al.*, 2002.)	**866** (Jann *et al.*, 1994.)
Escherichia coli O111	**1798** (Silipo *et al.*, 2002.)	**2205** (Ulmer *et al.*, 2002.)	**788** (Gupta *et al.*, 1995.)
Escherichia coli O21	**1798** (Silipo *et al.*, 2002.)	**2205** (Jann *et al.*, 1994.)	**893** (Ren *et al.*, 2008.)
Escherichia coli O55	**1798** (Silipo *et al.*, 2002.)	**2205** (Jann *et al.*, 1994.)	**861** (Manzo *et al.*, 2001.)
Escherichia coli O112	**1798** (Silipo *et al.*, 2002.)	**2205** (Jann *et al.*, 1994.)	**948** (Perepelov *et al.*, 2008a, Perepelov *et al.*, 2008b, Rietschel *et al.*, 1994.)
Escherichia coli O157	**1798** (Silipo *et al.*, 2002.)	**2208** (Currie & Poxton, 1999.)	**696** (Nishiuchi *et al.*, 2000.)
Escherichia coli 25922	**1798** (Silipo *et al.*, 2002.)	**2205** (Jann *et al.*, 1994.)	n.a.
Salmonella enterica sv. Adelaide O35	**2037** (Karibian *et al.*, 1993.)	**2089** (Noda *et al.*, 2001.)	**788** (Kenne *et al.*, 1983.)
Salmonella enterica sv. Minnesota vadtípus	**2037** (Karibian *et al.*, 1993.)	**2495** (Vukajlovich *et al.*, 1987.)	**934** (Vukajlovich *et al.*, 1987.)
Salmonella enterica sv. Urbana O30	**2037** (Karibian *et al.*, 1993.)	**2089** (Noda *et al.*, 2001.)	**696** (Samuel *et al.*, 2004.)
Proteus morganii O34	n.a.	n.a.	**811** (Makszin *et al.*, 2015.)
Proteus penneri 103	n.a.	n.a.	**865** (Drzewiecka *et al.*, 2002.)
Shigella flexneri 5	**1798** (Molinaro *et al.*, 2008.)	**1231** (Molinaro *et al.*, 2008.)	**992** (Perepelov *et al.*, 2010.)
		***R*-típus**	
Escherichia coli D31	**1798** (Wang *et al.*, 1992.)	**440** (Wang *et al.*, 1992.)	
Salmonella enterica sv. Minnesota R595	**2291** (Brandenburg *et al.*, 1998, Brandenburg *et al.*, 2003.)	**563** (Brandenburg *et al.*, 1998.)	
Shigella sonnei 4303 (phase II)	**1798** (Kilár *et al.*, 2011.)	**2068** (Kilár *et al.*, 2011.)	
Shigella sonnei 41	**1798** (Kilár *et al.*, 2011.)	**905** (Kilár *et al.*, 2011.)	

n.a. nincs adat

Azoknál az endotoxinoknál, ahol mindhárom alkotóelemre (lipid A, core és O-oldallánc) vonatkozó molekulatömeg adat ismert, ábrázolható a logM *vs.* 1/t diagram, ahol t az egyes LPS komponensek (csúcsok) elektroforetikus vándorlási ideje (**19. ábra**). Az ismert szerkezetű endotoxin kivonat komponensek esetében két különböző meredekségű kalibrációs egyenes rajzolódott ki. Az LPS-ek mikrochip elektroforetikus profilja alapján definiált *1.a csoportba* tartozó endotoxin molekuláknak a *logM – 1/t* egyenese eltérő lefutású az *1.b* és *1.c* csoportok egyeneseinek lefutásához képest.



19. ábra A logM – 1/*t* függvény ábrázolása ismert tömegű LPS komponensekre. A mikrochip profil szerinti *1.a* (négyzet), *1.b* (kör) és *1.c* (háromszög) csoportba tartozó LPS kivonat komponensek kalibrációs egyeneseit az 12., 13. és 14. ábrákon látható elektroferogramokról leolvasott, átlagolt *t* vándorlási idők adataiból határoztuk meg.

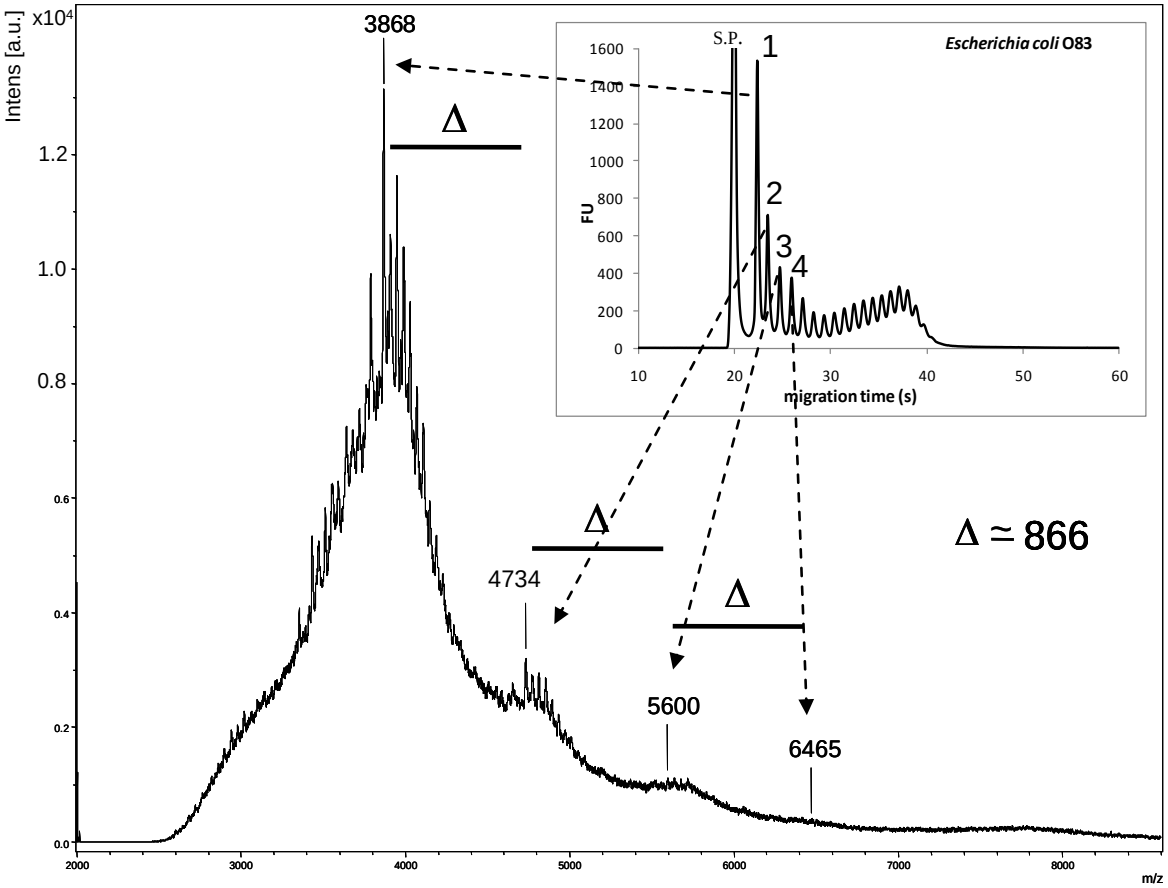
Ezen kalibrációs egyenesek segítségével meghatározhatók olyan endotoxinok alkotóelemeinek (*pl.* lipid A és/vagy core, O-oldallánc ismétlődő egység) molekulatömegei, melyeknek legalább egy alkotójának szerkezete/összetétele már ismert. A **3. táblázat** ilyen, máig nem vizsgált LPS szerkezeti egységek becsült molekulatömegeit tartalmazza, amelyeket az általunk meghatározott kalibrációs egyenesek segítségével adtunk meg (Makszin *et al.*, 2012.). A számolás hibája ismert szerkezetű endotoxinok számolt molekulatömeg adataiból lett megadva.

3. táblázat Gram-negatív baktériumokból származó LPS alkotórészek molekulatömeg adatai az ismert szerkezetű endotoxin komponensek kalibrációs egyeneseiből kifejezve

Baktériumtörzs	**lipid A + core (Da)**	**ismétlődő egység (Da)**
Escherichia coli 25922	**3819** (Silipo *et al.*, 2002.)	854 ± 20
Proteus morganii O34	4444 ± 20	806 ± 20
Proteus morganii 352	3456 ± 20	803 ± 20
Proteus morganii 1594	4110 ± 20	468 ± 20
Proteus penneri 101	3996 ± 20	934 ± 20
Proteus penneri 102	3870 ± 20	935 ± 20
Proteus penneri 103	3870 ± 20	880 ± 20 **865** (Drzewiecka *et al.*, 2002.)
Proteus penneri 104	3719 ± 20	925 ± 20
Proteus penneri 105	4127 ± 20	822 ± 20

Az intakt endotoxinok elektroforetikus profiljai közvetlenül is összevethetők azok tömegspektrometriával kapott eredményeivel, amennyiben rendelkezésre áll értékelhető tömegspektrum az endotoxinokról (tudvalevő, hogy az S-LPS-ek ionizálása és detektálása tömegspektrometriával igen nehézkes). Ily módon, egymást kiegészítő információk nyerhetők az endotoxin-molekulák szerkezetéről.

Az **20. ábrán** az intakt *E. coli* O83 LPS *m/z* 2500–10000 tömegtartományban felvett negatív ion MALDI-TOF tömegspektruma és mikrochip elektroferogramja látható. A tömegspektrumon megjelennek a $[M–H]^–$ kvázi-molekulaionok, melyek egy foszfátcsoport deprotonálódásával keletkeztek az ionforrásban. Összesen négy csúcshalmaz látható. Az első csúcshalmazt (*m/z* 3400–4400 közti tömegtartomány) a lipid A + core részt tartalmazó LPS komponensek ionjai alkotják, míg a többi csúcshalmaz (feltételezhetően a leginkább ionizálható) 1, 2 és 3 O-poliszacharid ismétlődő egységet tartalmazó, intakt S-LPS kvázi-molekulaionjaiból erednek. Az egyes csúcshalmazokon belüli legnagyobb intenzitású ionok tömegértékei rendre 3868, 4734, 5600 és 6465 Da, a köztük levő tömegkülönbség (*kb.* 866 Da) pedig megegyezik az *E. coli* O83 LPS egy O-oldallánc ismétlődő egységének tömegével, ami megfelel egy glükóz, két galaktóz, egy glükózamin és egy glükuronsav molekuláknak (5 vízmolekula kilépéssel számolva) (Jann *et al.*, 1994.). Minthogy a mikrochip elektroferogramon megjelenő első négy csúcs is rendre a 0, 1, 2 és 3 O-poliszacharid ismétlődő egységet tartalmazó LPS komponenseknek felel meg, következésképp a tömegspektrumról leolvasott tömegértékek hozzárendelhetők az elektroferogramon megjelenő első négy csúcshoz.

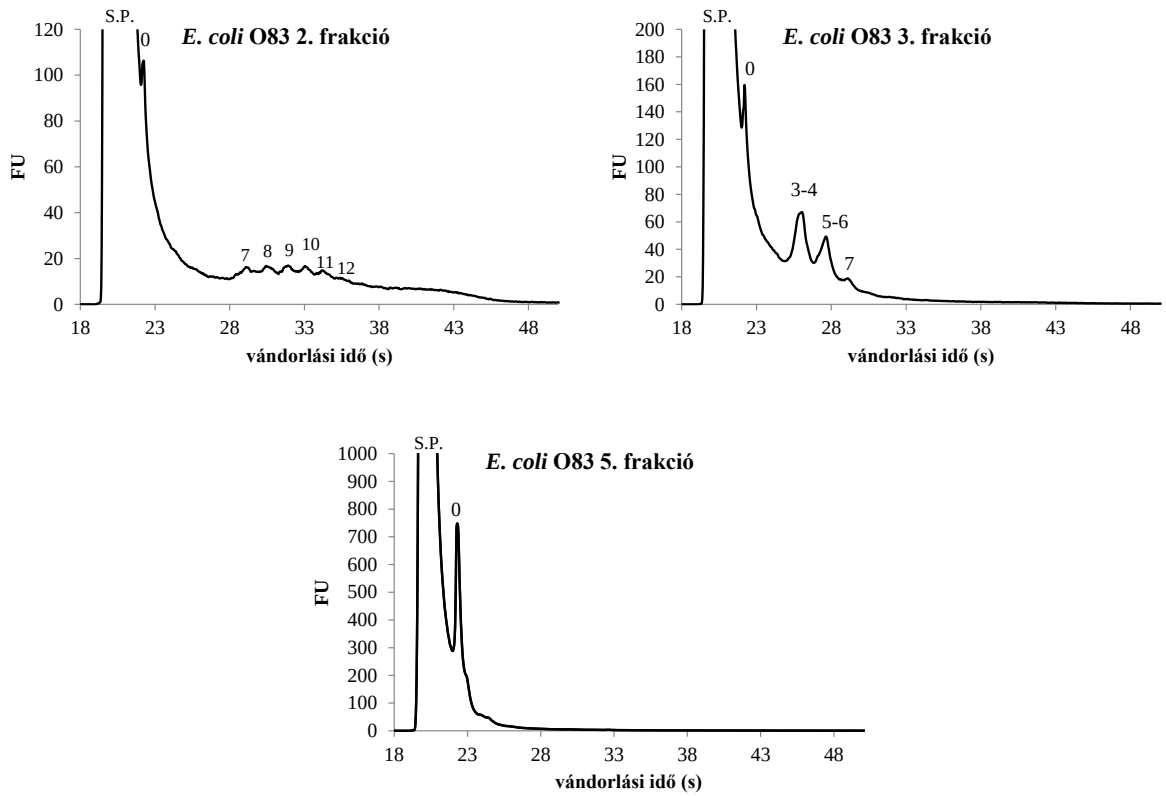


20. ábra *E. coli* O83 LPS lineár módban felvett negatív ion MALDI-TOF tömegspektruma és a mikrochip elektroforetikus mintázata (beillesztett ábra). A mikrochip elektroferogramban az első számozott mintacsúcs az LPS lipid A és core részét tartalmazó komponensét mutatja (*m/z* = 3868 Da), míg az azt követő mintacsúcsok egymáshoz képest olyan tömegkülönbséggel (Δ*m/z* = 866 Da) jelennek meg, amely megegyezik az LPS O-oldalláncát kialakító ismétlődő egységének tömegével.

Az elektroferogramon ebből a szabályszerűségből és a csúcsok számából következtetni lehet az O-oldallánc ismétlődő egységeinek számára (kezdve 1-19-ig) és tömegére. Ennek alapján az *E. coli* O83 LPS legtöbb (19) ismétlődő egységet tartalmazó komponensének molekulatömege *kb*. 20 300 Da. A *logM-1/t* egyenes alátámasztja ezt a molekulatömegértéket.

5.1.4 Degradált O-poliszacharidok kimutatása MGE módszerrel

Oszlopkromatográfiával Sephadex oszlopon elválasztott *E. coli* O83 LPS frakciókat mikrochipen megfuttattuk. A kapott elektroferogramokból megállapítottuk, hogy az 1. frakció a teljes, hidrolizálatlan LPS-nek felel meg (**12a ábra**), a 2. és a 3. frakciók a DPS oligoszacharidokat (core + degradált, különböző számú ismétlődő egységből álló O-oldallánc), illetve az 5. frakció már csak monoszacharidokat (core) tartalmazott (**21. ábra**).



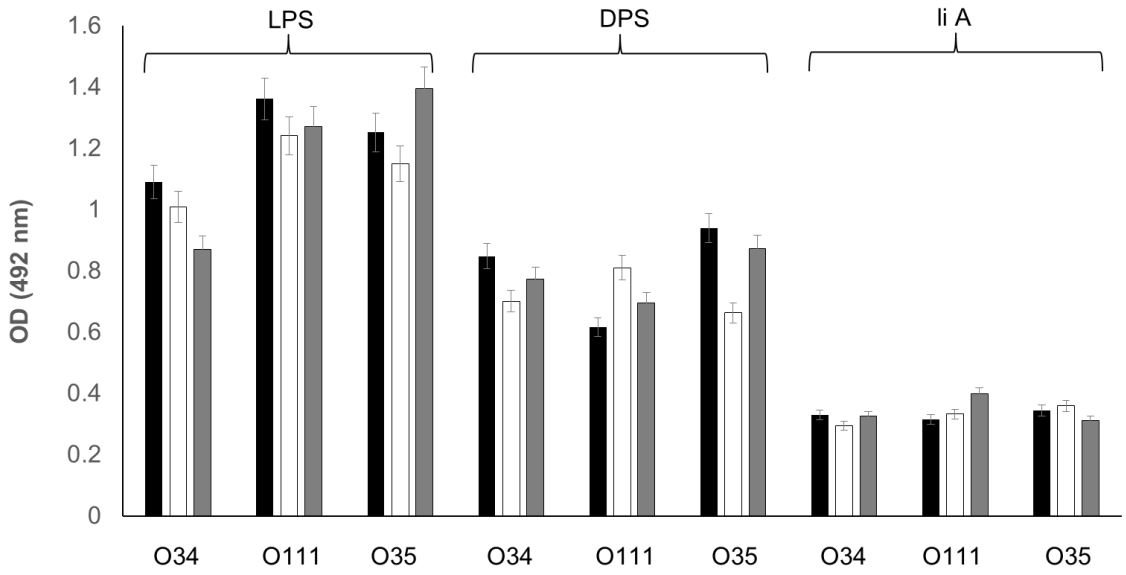
21. ábra *E. coli* O83 LPS Sephadex G-50 oszlopon elválasztott különböző frakcióinak mikrochip elektroforetikus profiljai

5.2 Szerológiai keresztkapcsolatok és szerkezeti hátterük vizsgálata

5.2.1 Jellemzés ELISA-tesztekkel

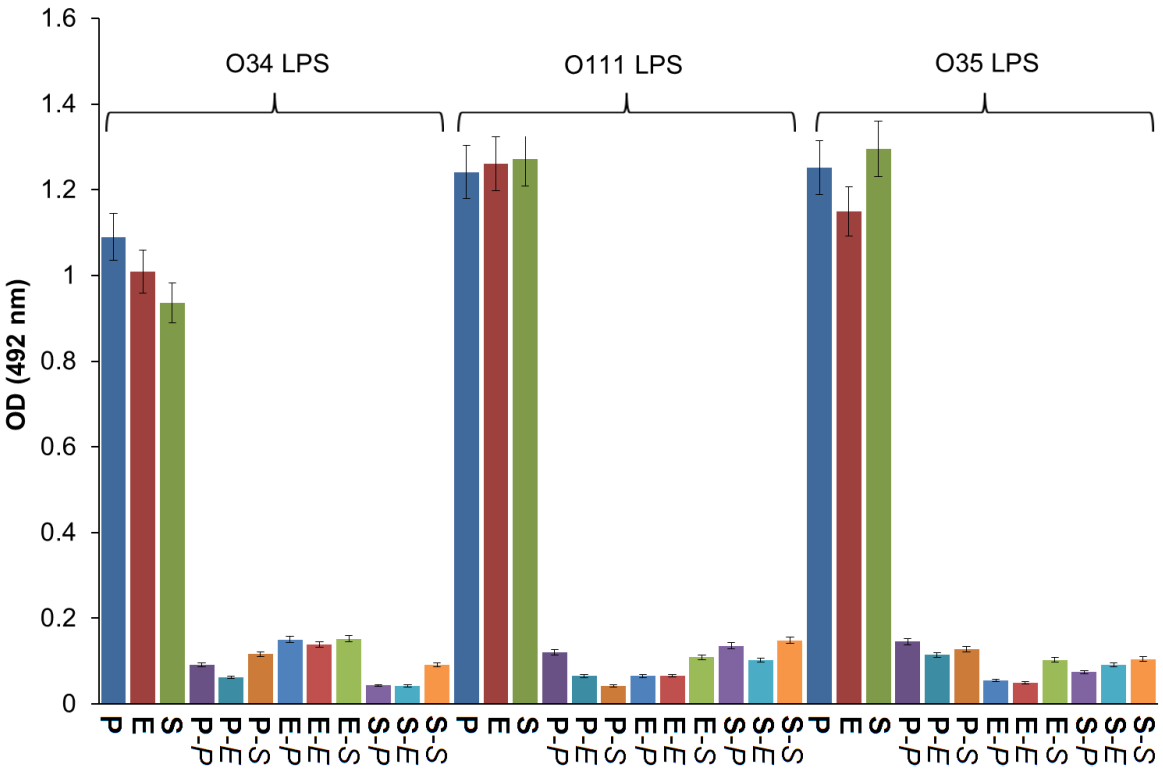
Kétfajta ELISA tesztet használtunk a *P. morganii* O34, *E. coli* O111 és *S. enterica sv. Adelaide* O35 törzsekből kivont endotoxinok közti keresztreakció igazolására. A lemezek érzékenyítéséhez a vizsgált baktériumokból nyert LPS-ket, degradált poliszacharidokat és lipid A-kat használtuk, majd inkubáltuk a baktériumok ellen nyulakban termeltetett kezeletlen antiszérummal és ezzel párhuzamosan a különböző antigénekkel kimerített, például hővel elölt teljes baktériummal kezelt savókkal is (**22. ábra**).

A mért optikai denzitás értékek alapján szoros keresztreakciót találtunk *E. coli* O111 és *S. enterica sv. Adelaide* O35 LPS minták között (OD 1,15-1,36), míg kicsit alacsonyabb kölcsönhatás figyelhető meg *P. morganii* O34 LPS esetében (OD_{492} 0,87-1,09). A három baktériumból származó degradált poliszacharid és lipid A mintáknál egymáshoz hasonló keresztreakció észlelhető bármely keresztreagáló szérummal, de szignifikánsan alacsonyabb intenzitás figyelhető meg, mint az intakt LPS-ek esetében.



22. ábra ELISA keresztreakció vizsgálata. *P. morganii* O34, *E. coli* O111 és *S. enterica sv. Adelaide* O35 baktériumokból származó intakt LPS, DPS, lipid A (liA) minták felvitele ELISA lemezekre, és reagáltatva nyúlban termelt antiszérummal *P. morganii* O34 (fekete oszlop), *E.coli* O111 (fehér oszlop) és *S. enterica sv. Adelaide* O35 (szürke oszlop) ellen. Az immunológiai keresztreakciót kecskében termelt anti-nyúl-IgG-hez kötött o-fenilén diamin peroxidáz szubsztráttal mutattuk ki optikai denzitás mérésével 492 nm-en.

A hővel elölt baktériumsejtekkel kimerített antiszérumokkal végrehajtott ELISA-tesztek („antitest kimerítéses vizsgálatok”) eredménye a **23. ábrán** látható. Az ELISA reakció látványos csökkenése látható a hővel elölt baktériumos kezelés nélküli, „kezeletlen” nyúl antiszérumhoz képest. Ez bizonyítja a nagyfokú szerológiai egyezést a három baktériumtörzs között.



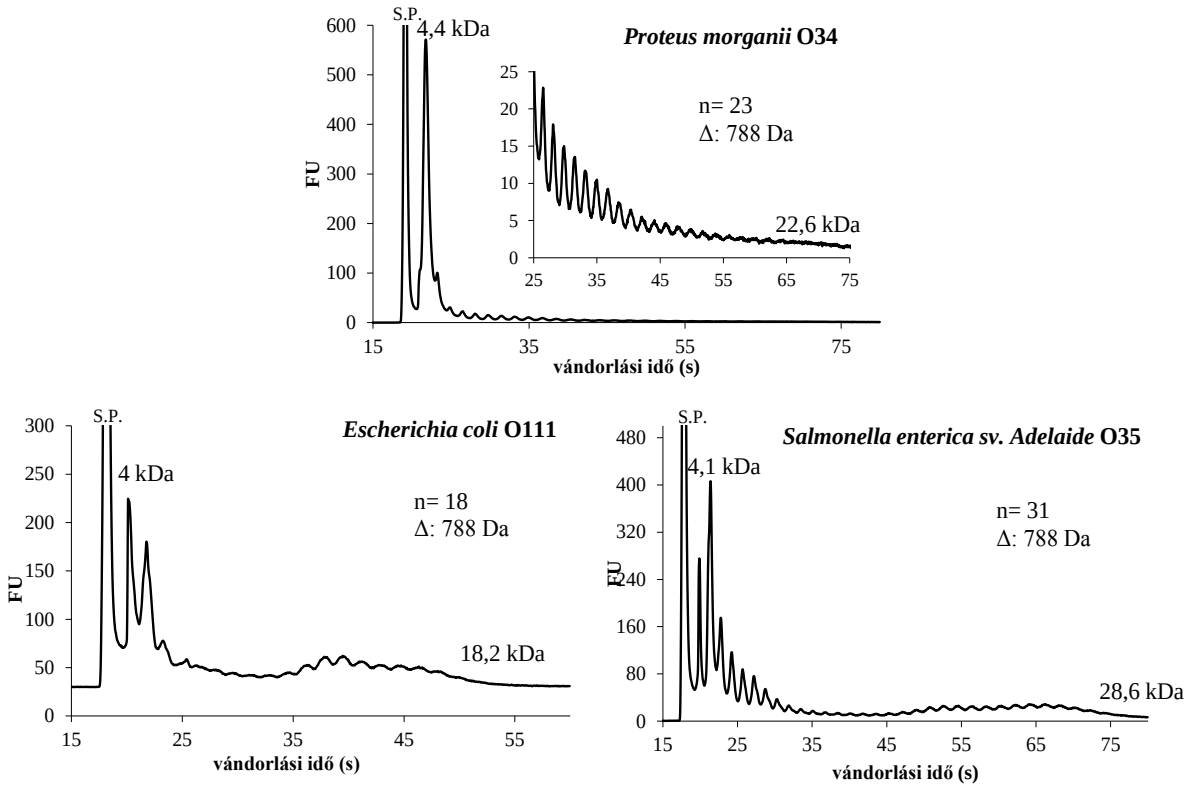
23. ábra ELISA antitest kimerítéses vizsgálat, azaz a keresztreakció ellenőrzése *P. morganii* O34, *E. coli* O111 és *S. enterica sv. Adelaide* O35 baktériumokból származó lipopoliszacharid és ezen baktériumok ellen termeltetett nyúl antiszérum között. Az LPS minták (O34 LPS, O111 LPS vagy O35 LPS) ELISA lemezhez kötése után alkalmazott antiszérumok: **P** – *P. morganii* O34, **E** – *E. coli* O111 és **S** – *S. enterica sv. Adelaide* O35 baktériumok endotoxinjai ellen lettek termeltetve. A **P**-*P*, **E**-*P*, **S**-*P* jelölésű, a **P**-*E*, **E**-*E*, **S**-*E* jelölésű, és a **P**-*S*, **E**-*S*, **S**-*S* jelölésű antiszérumok hővel elölt *P. morganii* O34 (*P*), *E. coli* O111 (*E*), és *S. enterica sv. Adelaide* O35 (*S*) baktériumokkal lettek kimerítve. Az LPS-ek és a különböző kezeletlen- és kezelt antiszérumok közötti immunológiai keresztreakciót kecskében termelt anti-nyúl-IgG hozzáadásával és o-fenilén-diamin peroxidáz szubsztrát jelölésével (optikai denzitás mérésével 492 nm-en) határoztuk meg.

5.2.2 Mikrochip gélelektroforézis

A három, egymással keresztkapcsolatot létesítő baktérium lapgél elektroforetikus és immunoblot profiljaiban finom különségek láthatók a létra sávok eloszlásában és intenzitásában (**8. ábra**). Ez a különbség jobban detektálható és mennyiségileg is meghatározható az intakt LPS-ek mikrochip elektroforézisével.

Az intakt keresztreagáló LPS molekulák MGE profiljai szignifikáns különbséget mutatnak vándorlási idő (molekulatömeg) tartományban és a különböző ismétlődő egységet tartalmazó endotoxin komponensek relatív mennyiségében is. A *P. morganii* O34 endotoxin mintánál a 13 kDa molekulatömegű LPS komponenstől kezdve csökkenő relatív mennyiségek

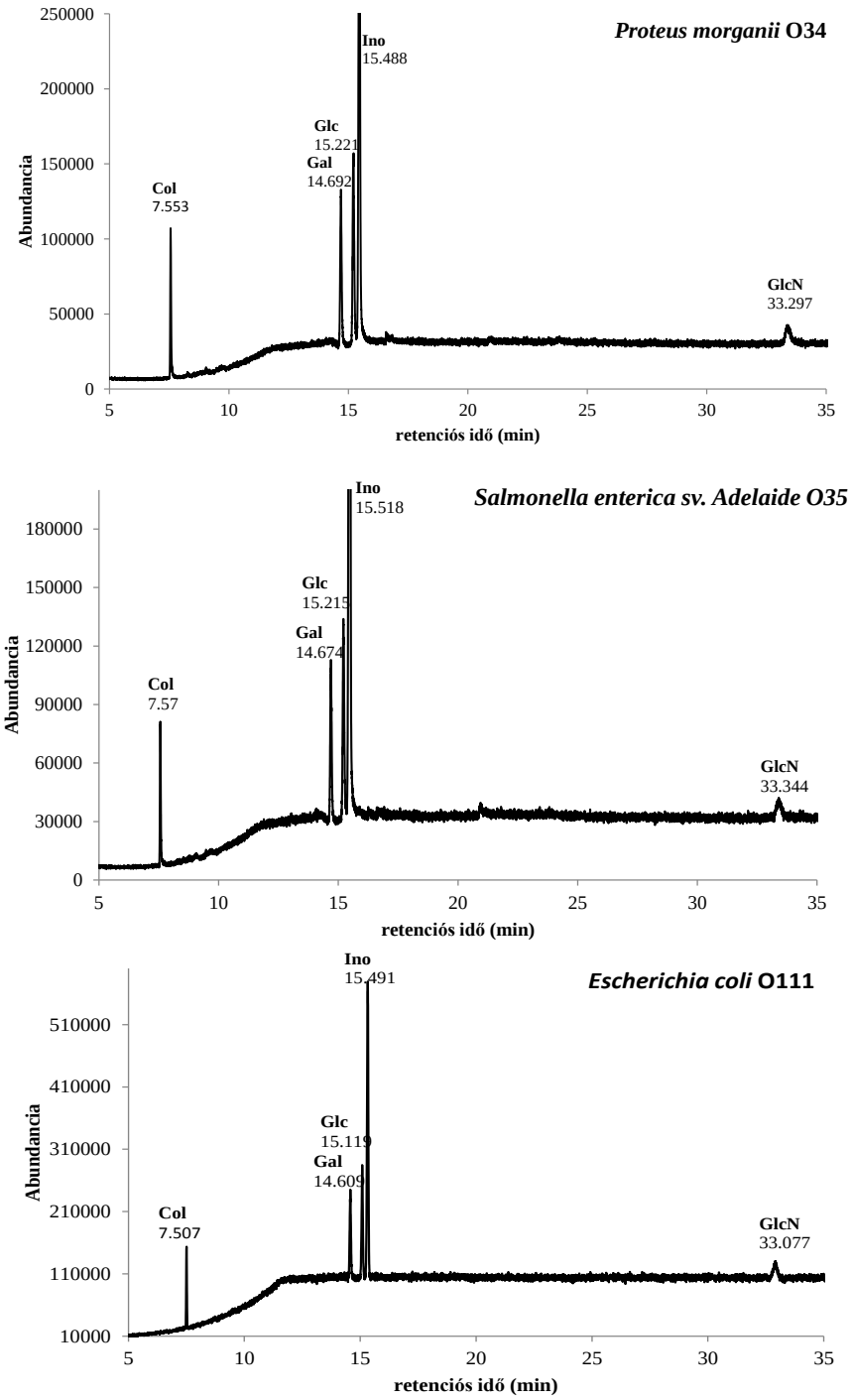
figyelhetők meg, míg az *E. coli* O111 LPS-nél a relatív mennyiségek maximuma figyelhető meg 11 és 18 kDa között, a *S. enterica sv. Adelaide* O35 LPS-nél pedig ez a maximum 18-29 kDa tartományon belül van (**24. ábra**). Látható az is, hogy mindhárom baktériumban azonos tömegű (következésképp azonos szerkezetű) O-oldallánc ismétlődő egység található (Δ=788 Da), ám ezek száma (n) a különböző baktériumok O-poliszacharidjában eltérő.



24. ábra *P. morganii* O34, *E. coli* O111 és *S. enterica sv. Adelaide* O35 baktériumokból származó endotoxinok mikrochip elektroforetikus profiljai. A mérési körülmények megegyeznek a 12. ábra aláírásában leírtakkal.

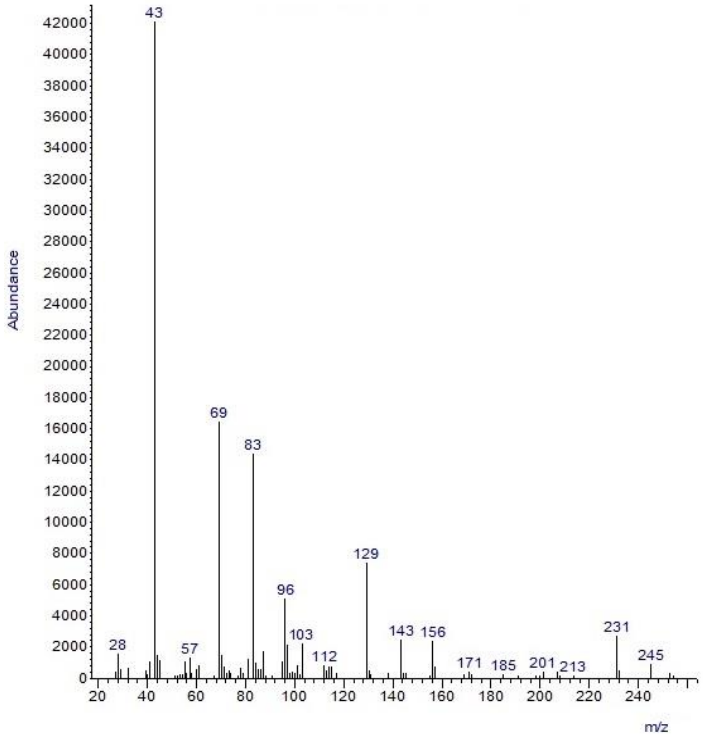
5.2.3 O-poliszacharidok GC-MS vizsgálata

A három, szerológiailag keresztreagáló baktériumból származó hidrolizált O-poliszacharidok monoszacharid tartalmát alditol-acetát származék formájában vizsgáltuk gázkromatográfia–tömegspektrometria kapcsolt módszerrel. A gázkromatográfiás spektrum alapján mindhárom O-poliszacharid hasonló monoszacharidokból épül fel, azaz tartalmaz D-glükózt, D-galaktózt, glükózamint és kolitózt (**25. ábra**). A D-glükóz, D-galaktóz és glükózamin mólaránya 1:1:1.



25. ábra A *P. morganii* O34, *E. coli* O111 és *S. enterica sv. Adelaide* O35 baktériumokból származó lipopoliszacharid hidrolizátumokból kapott monoszacharidok alditol-acetát származékainak GC-MS kromatogramjai. Rövidítések: Col: kolitóz (3,6-dideoxi-L-galaktóz), Gal: galaktóz, Glc: glükóz, GlcN: glükózamin, Ino: inozitol (belső standard).

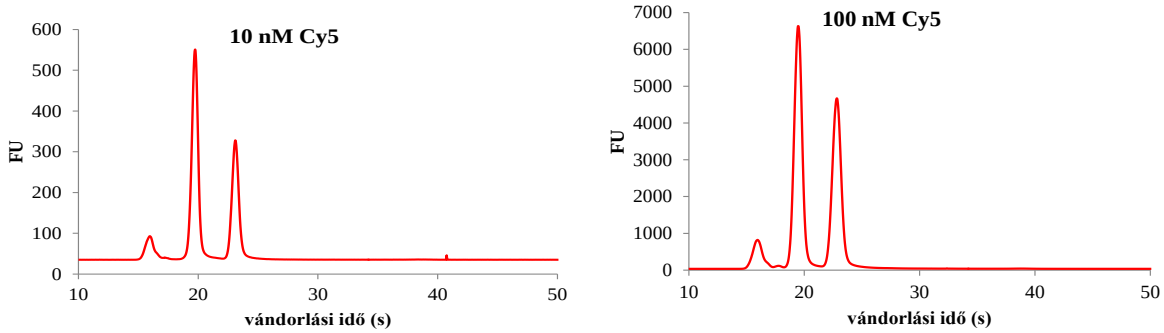
A szénhidrátok GC-MS azonosításához az MS spektrumkönyvtárát hívtuk segítségül. A kolitóz MS képe a **26. ábrán** látható. Természetesen a relatív retenciós idők összehasonlítása is nélkülözhetetlen a különböző konformációjú, de azonos molekulatömegű cukoregységek meghatározásánál, *pl.* a galaktóz és a glükóz megkülönböztetésekor.



26. ábra GC-MS elválasztáskor detektált kolitóz alditol acetát formájának elektron ütköztetéses ionizációval kapott tömegspektruma (*ld.* **25. ábra** 7,5 perc). A molekulaion fajlagos tömege (*m/z*) 318, míg a fő fragmens ion csúcsok: *m/z* 69, 83, 96, 103, 129, 143, 156, 231.

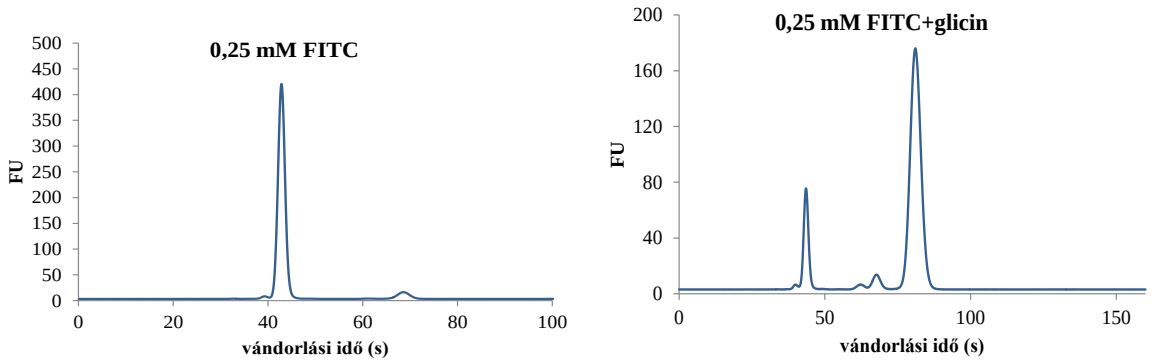
5.3 Endotoxinok vizsgálata MZE módszerrel

Az endotoxinokat ugyanúgy, mint a fehérjéket, DNS és RNS molekulákat fluorofórokkal jelölhetjük. Az endotoxinok Agilent-festékkel való fluoreszcens jelöléséről már esett szó a 4.7 fejezetben, de ismert szerkezetű és molekulatömegű fluoreszcens festékekkel is megjelöltük, mint *pl.* a Cy5 (gerjesztés 649 nm-en, emisszió 670 nm-en, vörös lézerrel detektálható), FITC (gerjesztés 494 nm-en, emisszió 518 nm-en, kék lézerrel gerjeszthető), melyek az Agilent festékhez hasonlóan az LPS-ek szabad $-NH_2$ csoportjához kötődnek. Az endotoxinokból származó jelek kiszűréséhez először a fluoreszcens festékeket vizsgáltuk külön-külön. A Cy5 festék esetében három jól elkülönülő jel detektálható, vélhetően a Cy5 három különböző komponense 16, 20 és 24 s-nál (**27. ábra**).



27. ábra 10 nM és 100 nM koncentrációjú Cy5 festék elektroferogramjai MZE módszerrel. Mérési körülmények: kapilláris rendszer: RNS chip, futtató közeg 4 mM SDS-t tartalmazó 100 mM-os BGE puffer, pH 8,3, elektrokinetikus injektálás 1300 V-on 45 s-ig, elválasztás 800 V-on (*kb*.19 kV/m) 120 s-ig, lézer-gerjesztés 635 nm, fluoreszcens detektálás 680 nm-en.

A FITC festék esetében is három, jól elváló jel látható, de eltérő vándorlási időkkel (39,2; 42,9 és 68,5 s), amelyek a FITC-el jelölt glicin futtatása esetén jól elkülönülnek a jelölt aminosav csúcsoktól (**28. ábra**).



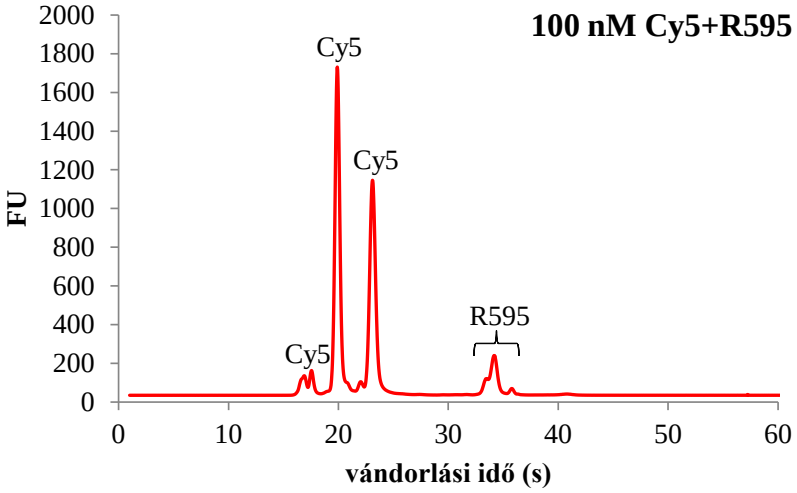
28. ábra 0,25 mM FITC festék, illetve a 0,25 mM FITC festékkel jelölt glicin elektroferogramjai MZE módszerrel. Mérési körülmények: kapilláris rendszer: RNS chip, futtató közeg 4 mM SDS-t tartalmazó 100 mM-os BGE puffer, pH 8,3, elektrokinetikus injektálás 1300 V-on 45 s-ig, elválasztás 800 V-on (*kb*.19 kV/m) 160 s-ig, lézer-gerjesztés 470 nm, fluoreszcens detektálás 525 nm-en.

Az aminosavak karboxil-csoportja pH=9,3-as borát-pufferben deprotonálódik, és a negatív töltés miatt a pozitív pólus (anód) irányában mozdulnak el elektromos erőtérben.

A kemotípusra nem feltétlenül tipikus elektroferogramokat kaptunk Cy5 festékkel jelölt endotoxinok esetében (**29-31. ábrák**), 4 mM SDS-t tartalmazó 100 mM borát puffer (pH 8,3)

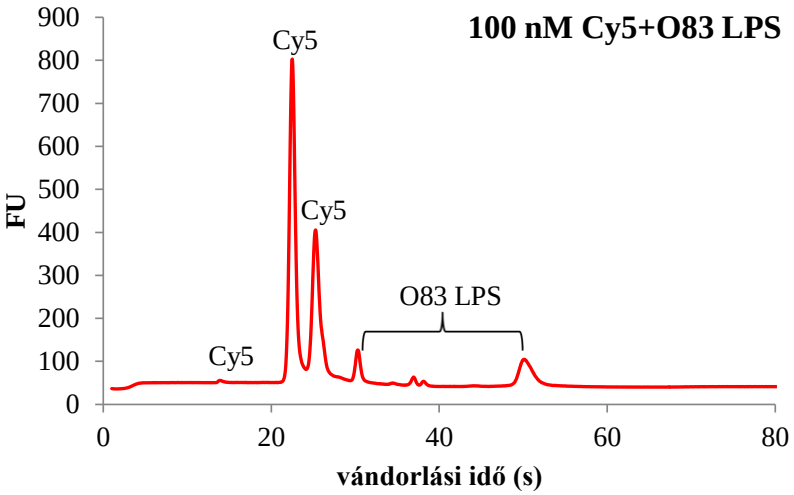
jelenlétében. A borát pKa értéke 9,25; a puffer kapacitása megfelelően magas (20% körüli maximum kapacitással). A méréseket az eredeti protokolltól eltérő injektálási- és elválasztási idővel, valamint eltérő injektálási- és elválasztási feszültségen végeztük. A mintához nem kötődött fluoreszcens festék három, egymástól jól elkülönülő csúcsban jelenik meg, kis vándorlási időknél (16,8; 20,0 és 23,0 s).

A *S. enterica sv. Minnesota* R595 endotoxinok esetében a festék komponensek csúcsai után megjelenő mintajelekhez tartozó vándorlási idők: 33,4 s; 34,2 s és 35,5 s (**31. ábra**). Ez alapján biztosan állítható, hogy a vizsgált mintában a feleslegben lévő Cy5 festék után megjelenő csúcsok a Cy5 NHS észterrel jelölt *S. enterica sv. Minnesota* R595 endotoxinok fluoreszcenciájából származik.



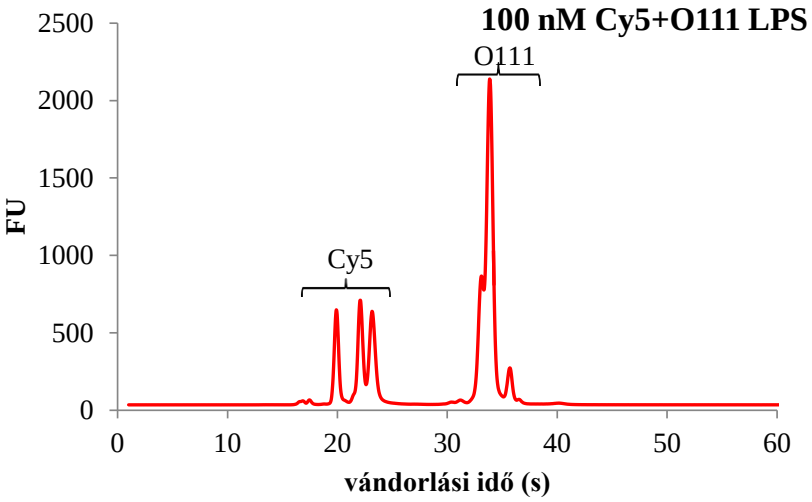
29. ábra 100 nM Cy5 fluoreszcens festékkel jelölt *Salmonella enterica sv. Minnesota* R595 baktériumból származó endotoxinok elektroferogramja MZE módszerrel.

Az *E. coli* O83 endotoxinok esetében a nem kötődött festék csúcsai (17,8; 22,6 és 25,3 s) után megjelenő festék-endotoxin mintacsúcsokhoz tartozó vándorlási idők: 30,3 s; 36,9 s; 38,2 és 51,8 s (**30. ábra**), melyek a Cy5 NHS észterrel jelölt *E. coli* O83 endotoxinok fluoreszcenciájából származik.



30. ábra 100 nM Cy5 fluoreszcens festékkel jelölt *E. coli* O83 baktériumból származó endotoxinok elektroferogramja MZE módszerrel.

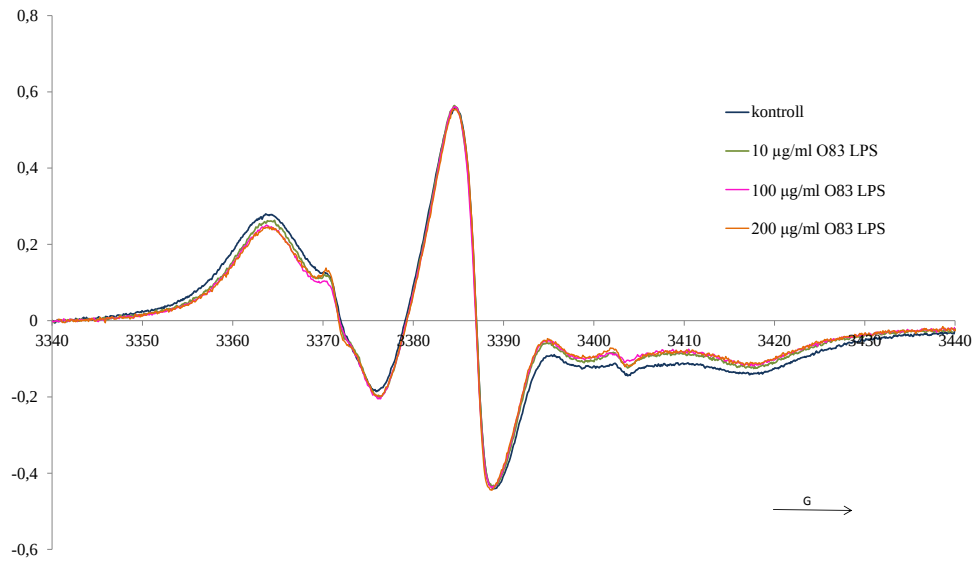
Az *E. coli* O111 endotoxinok esetében a nem kötődött festék csúcsai (16,8; 19,9 és 23,2 s) után megjelenő csúcsokhoz tartozó vándorlási idők: 33,3 s; 33,9 s és 35,7 s (**31. ábra**), melyek a Cy5 NHS észterrel jelölt *E. coli* O111 endotoxinok fluoreszcenciájából származik.



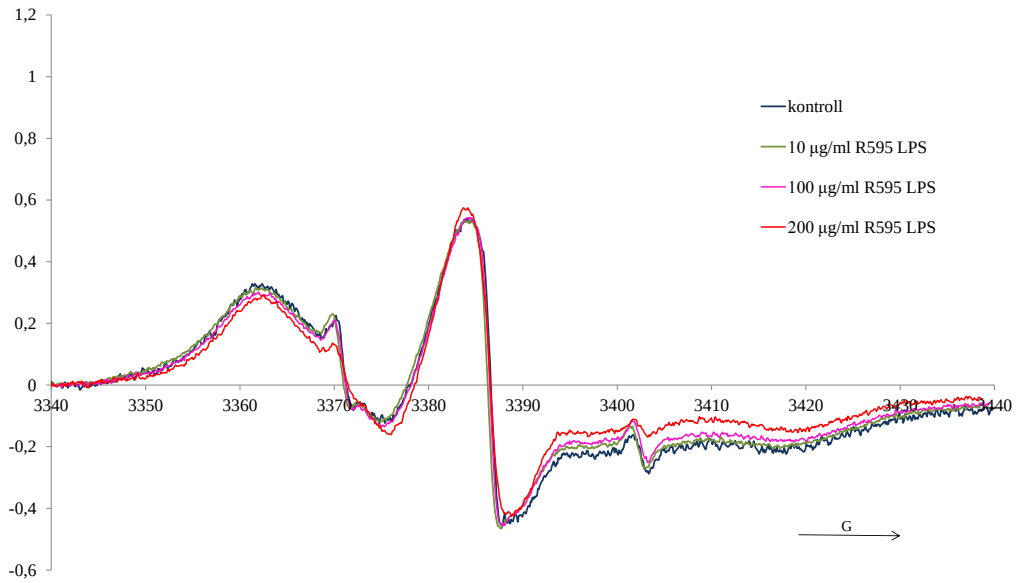
31. ábra 100 nM Cy5 fluoreszcens festékkel jelölt *E. coli* O111 baktériumból származó endotoxinok elektroferogramja MZE módszerrel.

5.4 Endotoxinok vörösvértest membránra gyakorolt hatásának vizsgálata

Az endotoxin molekulák humán vörösvértestek membránjára gyakorolt hatását EPR-technikával tanulmányoztuk. Méréseink szerint az endotoxinokkal kezelt membránokhoz kötött 5-SASL jelölők mozgékonyságára jellemző HWHH (*half-width at half-height*) értékek kisebbek a kontroll-minták esetén kapott értékeknél. A kétféle endotoxinnal kezelt mintára vonatkozó EPR spektrumok a **32.** és **33. ábrákon**.



32. ábra *E. coli* O83 endotoxinokkal kezelt vörösvértestek membránjához kötött 5-SASL EPR spektrumai. Az endotoxinok koncentrációja 0 és 200 µg/ml között változott a kezelés során



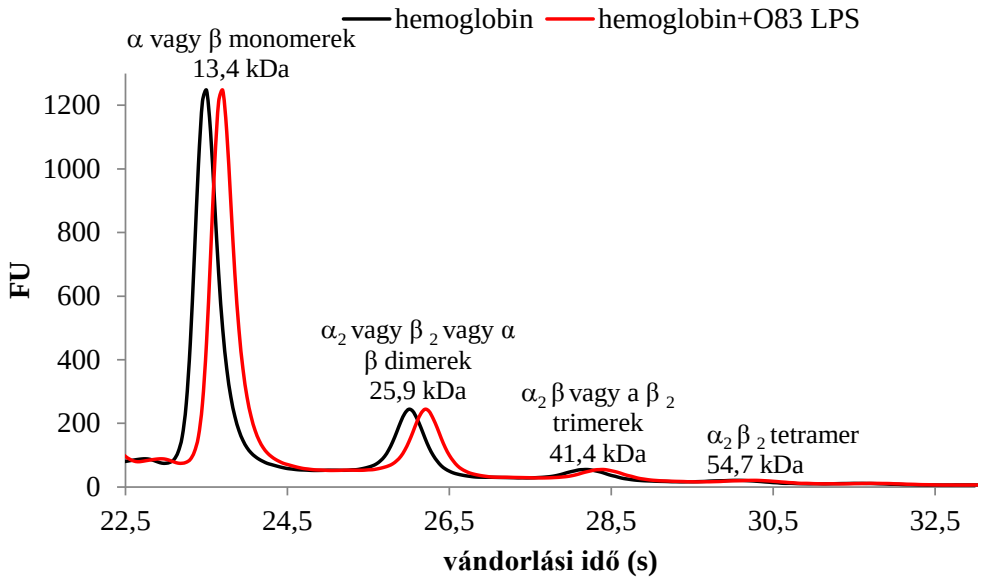
33. ábra *S. enterica sv. Minnesota* R595 endotoxinokkal kezelt vörösvértestek membránjához kötött 5-SASL EPR spektrumai. Az endotoxinok koncentrációja 0 és 200 µg/ml között változott a kezelés során.

A spekrumok alapján számolt HWHH értékek pedig a **4. táblázatban** találhatók.

4. táblázat *E. coli* O83 és *S. enterica sv. Minnesota* R595 baktériumok endotoxinjaival kezelt és kezeletlen vörösvértestek membránjához kötött 5-SASL spektrumaira jellemző HWHH értékek (I_{+1} szélsőértéknél számolva)

	E. coli O83	*S. enterica sv. Minnesota* R595
endotoxinok koncentrációja (µg/ml)	HWHH (G)	HWHH (G)
0	5,175 ± 0,090	5,181 ± 0,089
10	4,564 ± 0,057	4,814 ± 0,043
100	4,468 ± 0,068	4,733 ± 0,066
200	4,456 ± 0,067	4,588 ± 0,065

Vizsgáltuk az *E. coli* O83 baktériumból származó endotoxinok humán hemoglobinnal való kölcsönhatását. A gélelektroforézis képen látható, hogy a hemoglobin alegységek, és oligomerjeik vándorlási ideje *kb.* 0,2 s-al megnő az endotoxinnal történt kölcsönhatás következtében (**34. ábra**).



34. ábra Endotoxinok kimutatása humán hemoglobinhoz való kötődés alapján mikrochip gélelektroforézis módszerrel. Fekete vonallal a fluoreszcensen jelölt emberi hemoglobin elektroforetikus profilja látható (kontroll), piros vonallal az endotoxinok hozzáadása után kialakult, fluoreszcensen jelölt endotoxin – hemoglobin komplexek elektroforetikus profilja látható.

6. Eredmények értékelése

Az endotoxinok bioaktivitását elsősorban az elsődleges szerkezet határozza meg, úgymint az egyes baktérium törzsekből származó endotoxinok kémiai összetétele. Az endotoxinok szerkezeti jellemzéséhez egy analitikai módszer önmagában nem elegendő, több, átfogó módszer szükséges a molekulaszerkezet felderítéséhez, az endotoxin kivonatok komponenseinek molekulatömeg meghatározásához, relatív mennyiségek meghatározásához illetve az LPS-ek heterogenitásának jellemzésére. A nátrium-dodecil-szulfát (SDS) poliakrilamid lapgél- (*slab-gel-*) elektroforézis ezüstfestéssel kombinált technikája alkalmas az intakt endotoxinok heterogenitásának vizsgálatára, melyet a mai napig rutinszerűen alkalmaznak (Tsai & Frasch, 1982.). Az S-típusú endotoxinok „létra-mintázata" alapján az S- és az R-típusú endotoxinok, illetve a különböző S-típusú LPS-ek megkülönböztethetők egymástól. A „létra-sávok" az O-oldallánc ismétlődő egységeinek számát adják meg. Azonban sokszor előfordul, hogy elkülönülő sávok helyett széles (diffúz) elmosódó sávok jelennek meg a gélen, így a módszer felbontóképessége korlátozott (Kilár *et al.*, 2008a.). A lapgél-elektroforézis hátránya még, hogy munkaigényes, időigényes, nehéz automatizálni. Az endotoxin komponensek molekulatömegeinek és mennyiségeinek meghatározása pedig, megfelelő denzitometrálás nélkül nem lehetséges.

A korlátozott felbontóképesség miatt Kilár *és mtsai.* kidolgoztak egy, az endotoxinok szerkezeti változatainak meghatározására alkalmas mikrochip gélelektroforézis (MGE) módszert az *Agilent Protein 80,* illetve a *230 LabChip* kitek használatával. Ezekkel a módszerekkel a tisztított LPS molekulák, és a baktériumok sejtlizátumából részlegesen tisztított endotoxinok profilja, mintázata ujjlenyomatszerűen vizsgálhatók az LPS-SDS-fluoreszcens festék nemkovalens hármas komplexének analízise alapján (Kilár *et al.*, 2008a.). A molekulatömeg pontos meghatározása azonban sem az ezüstfestéssel kombinált SDS-PAGE-vel, sem az itt említett MGE módszerrel nem lehetséges, mert az elektroforézishez csak fehérje molekulatömeg-standard áll rendelkezésre.

Az általunk újonnan kidolgozott gyors és a korábbinál érzékenyebb MGE módszer fluoreszcens festékkel kovalensen jelölt, Gram-negatív bakteriális endotoxinok meghatározására alkalmas. Ennél a módszernél a fluoreszcens festék az LPS molekulák lipid A és/vagy core régiójában jelenlévő, szabad $–NH_2$ csoportjaihoz kötődnek 1:1 arányban, a fehérjék N-terminálisának jelöléséhez hasonlóan. Habár az elektroforetikus analízisnél az

eredeti alaplépéseket alkalmaztuk, a mintakészítés lépéseit és az alkalmazott oldatok koncentrációját, összetételét módosítottuk az eredetileg fehérjékre kidolgozott protokollhoz képest. A fluoreszcens festék mennyiségét csökkentettük oly módon, hogy a gyors mozgékonyságú lipid A + core egység jelintenzitását az elektroferogramokon elsőként megjelenő nagy intenzitású fluoreszcens festék+etanolamin komplexből álló rendszercsúcs ne fedje el. A gyorsabb mintaelőkészítés érdekében lerövidítettük az endotoxinok festési idejét 30 percről 10 percre, ez a lépés az elektroferogramokon a minták komponenseinek jelintenzitásában változást nem eredményezett. Viszont a lipid A + core egységet ezidáig nem sikerült elválasztani teljesen a rendszercsúcstól, így a mennyiségi kiértékelés erre a komponensre pontatlan. Ezután a fluoreszcens festék-endotoxin komplexek koncentrációját optimalizáltuk a legjobb felbontóképesség elérése érdekében. A mintaelőkészítés kidolgozása után a MGE detektálási idő paraméterét programoztuk át, hogy a 60 s-nál lassabban vándorló endotoxin komponensek is láthatóvá váljanak az elektroferogramokon. Így egymás után 11 endotoxin minta elválasztása valósítható meg 30 percen belül 10 minta elválasztásához rendelkezésre álló üveg mikrochipben.

Az általunk kidolgozott kovalens jelölést alkalmazó módszer kimutatási határa (S/N=3) jelentősen alacsonyabb (0,43 – 1,13 ng/µl) az endotoxin kivonat keverékben legnagyobb mennyiségben jelenlévő komponenseinek esetében, mint a korábban Protein 80 LabChip kitben kifejlesztett mikrochip módszernél (5 ng/µl) illetve az ezüstfestéssel kombinált SDS-PAGE módszernél (2 µg) (Kilár *et al.*, 2008a.). Ezért az LPS-ek chip elektroforetikus vizsgálata alkalmas lehet a hagyományosan használt ezüstfestéssel SDS-PAGE kiváltására, érzékenysége, gyorsasága, nagymértékű reprodukálhatósága és mennyiségi kimutatásának előnyei miatt. Hátránya az ezüstfestéssel kombinált SDS-PAGE módszerrel szemben az, hogy a komponensek elválasztása után a minta nem blottolható nitrocellulóz membránra, a gélből nem preparálható ki, így további „online” vizsgálata (MS) még nem megoldott.

Az újonnan kidolgozott MGE módszerrel sikeresen detektáltunk egyetlen baktériumtelepből származó sejttenyészetből, enzimatikus eljárással kivont endotoxin keverék komponenseket is. A baktériumtelepek tápoldatba való beoltásától a mérés befejezéséig eltelt idő *kb.* másfél nap volt. Ez a rutin laboratóriumi vizsgálatokban alkalmazott ezüstfestéssel kombinált SDS-PAGE módszerhez képest fele annyi időt jelent. Az endotoxinok elektroferogramjából egyértelműen el lehet dönteni az LPS-ek típusát, azaz hogy S vagy R-típusú baktériumból származott-e a minta. A vártnak megfelelően, az *E. coli* O83 LPS elektroferogramja nagymértékben megegyezik a hosszadalmas, Westphal-féle fenol-vizes eljárással kivont

endotoxinok elektroferogramjával. Míg az R-típusú (O-poliszacharid nélküli) *S. enterica sv. Minnesota* R595 LPS-eknél egy mintacsúcs volt detektálható ugyanúgy, mint a hosszadalmas, Galanos-féle fenol-kloroform-petroléteres eljárással kivont endotoxinok esetében. Ebből következik, hogy a tiszta LPS-ek eredményeinek ismerete nélkül is a sejttenyészetből származó endotoxinok azonosíthatók. Ezzel az eljárással az endotoxinok detektálási ideje jelentősen lerövidíthető, emellett a módszer jól reprodukálható, kevéssé idő- és anyagigényes. Módszerünkkel jól lehetne vizsgálni az egyetlen baktériumtelepből származó sejttenyészet LPS extraktum heterogenitását, mellyel választ kaphatnánk arra, hogy a Gram-negatív baktériumok tenyésztési körülményei milyen hatással vannak az LPS termelésre.

Az új chip-technikával lehetőség nyílik a heterogén endotoxin kivonat komponensek molekulatömegeinek meghatározása is. Eszerint az ismert szerkezetű lipopoliszacharidokra ábrázolt $log_{10}M$ – *1/t* egyenes „*belső standard”*-ként használható, ezáltal ismeretlen szerkezetű LPS-ek chip elektroforetikus méréséből vissza lehet következtetni annak molekulatömegére. Számos S-típusú LPS vizsgálata során két különböző meredekségű kalibrációs egyenest kaptunk, ahol a szerkezeti különbségek okozhatják a mobilitás változást. Mikrochip technikával, számszerű adatokkal meghatározható az LPS kivonatokban levő komponensek száma és relatív aránya. Az ismert szerkezetű LPS-ek tömegértékeit alkalmazva azt találtuk, hogy az *1. csoportba* tartozó LPS komponenseinek tömege *kb*. 24000 Da-ig terjed, míg a többi csoporthoz tartozó komponensek molekulatömegei 28500 Da értékekig terjednek. Az endotoxinok jellemzésekor a szerkezet lényegesen befolyásolja az elektroforetikus vándorlást (Jann *et al.*, 1994, Perepelov *et al.*, 2008a, Perepelov *et al.*, 2008b.).

Az LPS-eket csoportosítani lehet az elektroforetikus profiljuk alapján. Az R-típusú LPS komponens(ek) gyors vándorlásúak, kis molekulatömegűek, ezért gyakran a rendszercsúccsal átfedésben jelennek meg. Az S-típusú LPS komponensek többszörös „hullám-mintázatú” csúcsokként mutatkoznak. A csúcsok száma, eloszlása és a komponensek relatív mennyisége szerint az emdotoxinokat két csoportba, és az *1.* csoporton belül 3 alcsoportba (*1a, 1b* és *1c* csoportok) sorolhatjuk őket. A komponensek relatíve nagyobb mennyisége 13 vagy 15 ismétlődő egységhez tartozó molekulatömegeknél *kb*. 15500 Da-nál jelentkezik az *1a* csoportnál, míg *kb*. 17000-18000 Da között az *1b* csoportnál. A *2*-es csoporthoz tartozó LPS komponensek mennyiségében egy jól látható, határozott csökkenés figyelhető meg 28500 Da molekulatömegig egészen sajátosan, (*pl*. a *Proteus morganii* O34, 352 és 1594 baktériumok

az első endotoxin komponenst nagyjából 50-szer nagyobb mennyiségben termelik a legkisebb mennyiségben megjelenő komponenshez képest).

A különböző endotoxin komponensek mennyiségi arányait az SDS-PAGE kísérletekben is lehetett látni, de a meghatározása ott nehézkes, gyakorlatilag lehetetlen az alacsony felbontás és más technikai problémák miatt. További kísérletek szükségesek ahhoz, hogy a baktériumok által termelt endotoxin komponensek pontos mennyiségét az LPS szintézisek genetikai szabályozásának tükrében láthassuk.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy az elektroforetikus profil (a komponensek különböző molekulatömegének relatív eloszlása) nagyban reprodukálható. Ezt támasztja alá az azonos baktériumtörzsek különböző időben történő tenyésztését követően megegyező mennyiségi profil, ami mindig a komponensek azonos arányát eredményezte. A MGE módszer a részlegesen tisztított S és R-típusú LPS sejtlizátumok esetében is nagy felbontású elválasztást tesz lehetővé (Kocsis *et al.*, 2011b.).

Ezáltal, a proteináz K enzimatikus emésztésének módszerével kombinálva ez a technika rendkívüli érzékenységű és lehetővé teszi az LPS-ek típusának (azaz hogy S vagy R típusú baktériumból származott-e) meghatározását akár egyetlen baktérium izolált telepéből is.

Az intakt S-típusú *E. coli* O83 LPS tömegspektrometriás mérésével meghatároztuk a legjobban ionizálható komponensek molekulatömegeit és az alacsony molekulatömegű LPS-ek szerkezetét.

Foglalkoztunk a fluoreszcensen jelölt LPS molekulák mikrochip zónaelektroforézis (MZE) analízisével is. Jól ismert, hogy a makromolekulák, így az endotoxinok elektroforetikus vándorlása is nagymértékben függ makro- (O-oldallánc ismétlődő egységeinek száma, zsírsavláncok száma) és mikroheterogenitásuktól [zsírsavláncok hossza, a töltést hordozó funkciós csoportok száma és típusa (HPO_4^{2-}, $-H_2P_2O_7^-$, -PEt, -PPEt, -PCho, glicin, arabinóz, sziálsav)]. Az LPS molekulák pH: 2,3 felett negatív töltéssel rendelkeznek a lipid A régióban lévő foszfát csoportok és a core régióban lévő Kdo karboxil csoportjainak révén egyaránt. Különböző töltés/tömeg arányuk alapján, eltérő vándorlási sebességük miatt elektroforetikus körülmények között elválaszthatók egymástól, optikai detektálásuk fluoreszcens jelöléssel megoldható.

Az általunk kidolgozott MZE módszer segítségével intakt endotoxinokat az ismert szerkezetű és molekulatömegű Cy5 fluoreszcens festékkel kovalensen jelöltünk és az LPS-festék

komplexet vizsgáltuk LIF detektálás alkalmazásával. A Cy5 festék gerjesztési hullámhossza 649 nm, ami megfelel az Agilent Bioanalyzer 2100 készülék vörös lézerének. A Cy5 fluoreszcens festék könnyen reagál primer és szekunder aminokkal, így $–NH_2$ csoportot tartalmazó aminosavakkal és endotoxinokkal is.

Számos mintacsúcs figyelhető meg Cy5-el festett endotoxinok esetében, melyek valószínűleg a mintában lévő különböző LPS aggregátumoknak, vagy különböző számú Cy5 molekulákat hordozó LPS molekuláknak feleltethetők meg. Összehasonlítva a hagyományos kvarc kapillárisokban végzett CZE kísérletekkel, az analízis-idő a mikrochip esetében legalább egy nagyságrenddel kisebb (Freitag *et al.*, 1997.).

A mikrochip zónaelektroforézis és a mikrochip gélelektroforézis módszereket összevetve az SDS-PAGE gélelektroforézissel, az előbbiekkel jobban kiértékelhető, könnyebben kezelhető eredményeket és részletesebb szerkezeti információkat kaptunk az endotoxinok gyors meghatározásában.

Szerológiai keresztreakció immunkémiai hátterét vizsgáltuk három, klinikai szempontból fontos *Proteus (Morganella) morganii* O34 (8662/64), *E. coli* O111:K58:B4 és *S. enterica sv. Adelaide* O35 baktériumtörzsek esetében. A keresztreakciók megvilágítása segíti a szerodiagnosztikai tesztek jobb megértését. A keresztreakciót adó antigének tanulmányozása segíthet az egyes patogén baktériumok elleni vakcina megtalálásában. Az irodalomban csak néhány olyan esetet mutatnak be, ahol a baktériumok endotoxinjainak O-antigén szerkezete azonos, mint például az *E. coli* O111 és *S. enterica sv. Adelaide* O35 (Jann & Jann, 1984.), az *E. coli* O55 és *S. enterica* O50 (Jann & Jann, 1987.), *E.coli O157* és *S. enterica* O30 (Wang & Reeves, 2000.), *Vibrio cholerae* O1, *Shigella flexneri* 2a és *Haemophilus influenzae* b (Rabbi *et al.*, 2008.) baktériumok esetében.

Az ELISA és immunblot kísérletek egyértelműen bebizonyították, hogy a vizsgált baktériumtörzsek közötti szerológiai keresztreakcióért elsősorban az O-antigén felelős. Az LPS mellett a Gram-negatív sejtmembrán másik fő komponensei, a külső membránfehérjék (OMP) is adhatnak keresztkapcsolatot. Korábbi munka során ezeket a fehérjéket izolálták és elektroforetikus elválasztást követően a 36 ás 41 kDa külső membránfehérjéket blottolták nitrocellulóz membránra, majd kipreparálták azokat (Péterfi *et al.*, 2007.). A *P. morganii* O34, *E. coli* O111 és *S. enterica sv. Adelaide* O35 törzsek ezen külső membránfehérjéi ellen immunszérumokat állítottak elő nyúlban, amelyeket szerológiai tesztekben felhasználtak. Az

immunszérumok nagyfokú keresztreaktivitást mutattak mindhárom törzsnél, ami a külső membránfehérjék közti antigén-rokonságot támasztja alá.

Az elektroforetikus profilok alapján a különböző endotoxinokat különböző csoportokba sorolhatjuk. A *P. morganii* O34 baktériumból származó endotoxinok a *2.* csoportba tartoznak, folyamatosan csökkenő relatív mennyiséggel, míg az *E. coli* O111 és a *S. enterica sv. Adelaide* O35 az *1.b* ill. *1.c* csoportokba sorolhatók „hullámszerű" profillal (a komponensek relatív mennyiségének megfelelően), de különböző molekulatömeg régiókkal (**24. ábra**).

Az endotoxinok O-antigén szénhidrát összetevőinek azonosításához a *Proteus* O34, *E. coli* O111 és *S. enterica sv. Minnesota* O35 baktériumokból izolált intakt LPS-ekről gyenge savas hidrolízissel a lipid A-t eltávolítottuk, és a különböző LPS-ekből származó O-oldalláncot tovább hidrolizáltuk, hogy kinyerjük a monoszacharid komponenseket. Diagnosztikailag is alkalmazható GC-MS módszert fejlesztettünk ki, amivel az O-oldallánc szerkezeti azonosságát, monoszacharid összetételét vizsgáltuk. A GC-MS eredményekkel kimutattuk, hogy a *P. morganii* O34 endotoxinok O-oldallánca ugyanazokból a cukrokból épül fel – galaktóz, glükóz, glükózamin, kolitóz (3,6-dideoxi-L-galaktóz) – mint a másik két baktériumtörzs endotoxinjai (Alam *et al.*, 2004.) (**25. ábra**). Az O-antigénben jelenlévő kolitózt NMR vizsgálatok is alátámasztották. Mindez bizonyítja, hogy a *P. morganii* O34 (8662/64) endotoxinok O-oldalláncai azonos ismétlődő egységekből épülnek fel (Makszin *et al.*, 2015.), mint a korábban már megismert *E. coli* O111 és *S. enterica sv. Adelaide* O35 lipopoliszacharidoké (Gupta *et al.*, 1995.). A két kolitóz (3,6-dideoxy-L-galaktóz) a glükóz molekulán keresztül kapcsolódik a galaktózhoz és az N-acetil-glükózaminhoz. Úgy gondoljuk, hogy a természetben ritkán előforduló kolitóz fontos szerepet játszik a vizsgált baktériumtörzsek közti keresztreakció kialakulásában. Kimutatták, hogy az immunkémiailag fontos antigén egység a kolitóztartalmú triszacharid (dikolitozil-D-glükóz) elágazásnak felel meg (Iversen & Bundle, 1982, Kenne *et al.*, 1983.).

A keresztkapcsolat-vizsgálatok eredményeinek hasznát a következőképpen érthetjük meg. Miután az anti-LPS antitestek blokkolni képesek az *E. coli* O111 tapadását a humán intesztinális epithél sejtekhez, az *E. coli* O111 fertőzéssel szemben egy O-specifikus poliszacharid-fehérje konjugátumú vakcina lenne a legmegfelelőbb. Ebben az összefüggésben az *enterohemorrágiás E. coli* (EHEC) fertőzésekkel szembeni vakcinát a *P. morganii* O34-ből származó O-specifikus poliszachariddal lehetne kifejleszteni, mivel a *P. morganii* O34 és *E. coli* O111 közötti O-specifikus poliszacharid antigenicitásának hasonlósága bizonyított.

Tanulmányoztuk az endotoxinok biológiai hatásainak hátterét az endotoxin - humán vörösvértest plazmamembrán kölcsönhatáson keresztül. Az EPR eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az LPS-nek meghatározó szerepe van a humán vörösvértest zsírsavjainak membrándinamikai tulajdonságaira. Megállapították, hogy az endotoxinok a makrofágok és a monocyták aktiválása révén felszabadítanak primer és szekunder endogén mediátorokat (citokininek), melyek bonyolult kölcsönhatásba lépnek egymással (Butterfield *et al.*, 1994.).

Méréseink szerint a toxinnal kezelt vörösvértestek membránjai rigidebbek, mint a kezeletlen vörösvértesteké. A membrán zsírsavjaihoz kötött 5-SASL jelölő dinamikai változásait azzal magyarázzuk, hogy a nem-specifikus hidrofób kölcsönhatás az LPS-el és/vagy LPS komponensek interkalációjával jön létre (Gwozdzinski *et al.*, 2003.) (Roth *et al.*, 1993.).

A spin-jelölő által láttatott anizotróp tulajdonság tükrözi, hogy milyen a lipid molekulák molekuláris mozgása a membrán belsejében, ami összefüggésben van a membránok struktúrájával. A jelölő molekula a plazmamembrán lipid régiójában beépült és meghatározott mozgási szabadsággal rendelkezett, melyet az LPS molekula jelenléte csökkentett. A beékelődés egy nagyobb belső rendezettséget (rigiditást) eredményez a membrán belső szerkezetében és így csökkenti a lipidlánc 5-ös szénatomjához kötött jelölő mozgási szabadságát. Azzal, hogy megváltozik a lipid kettősréteg szerkezete, az ionok és metabolitok permeábilitása, a membrán enzimkötődés aktivitása és a hormon receptorok tulajdonsága is megváltozik (Kadota *et al.*, 1992). A kevésbé fluid membránnal rendelkező vörösvértestek lassabban haladnak a hajszálerekben, vagy képtelenné válhatnak a kapillárisokon való átjutásra. Ezáltal az oxigénszállítás csökkenhet, ami szövet, majd szervkárosodáshoz vezethet (Bellary *et al.*, 1994.). A membrán-rigiditás és szervezet oxigénellátottsága közötti összefüggés tanulmányozására munkám nem terjedt ki, egy másik tudományos kutatás célja lehet.

Számos tanulmányból ismeretes, hogy különböző fehérjék képesek komplex képződésre az LPS molekulákkal, mint *pl.* LPS-kötő fehérjék, lipoproteinek a plazmában, albumin, hemoglobin, transzferrin, lizozim és komplement fehérjék. Ezek közül néhány endotoxin-kötő fehérjét vizsgáltak affinitás kromatográfiás, autoradiográfiás és izoelektromos fókuszálás eljárással (Berger & Beger, 1987, Berger *et al.*, 1991, Kaca *et al.*, 1995, Schlichting *et al.*, 1996, Schumann *et al.*, 1990.). Kapilláris gélelektroforetikus méréseinkben kölcsönhatást tudtunk kimutatni a hemoglobin alegységek és az endotoxin-molekulák között, melyre a vándorlási idő növekedéséből következtethetünk. Kaca *és mtsai.* bemutatták, hogy a natív

humán hemoglobin (Hb) stabil komplexet képez a bakteriális endotoxinokkal (K_d = 3,16 x 10^{-8} M). A hemoglobin jelenléte fokozza az endotoxinok biológiai aktivitását (Kaca *et al.*, 1994.). Izotermális titrációs kalorimetriával meghatározták a moláris [Hb] : [endotoxin] kötődést (1:5 és 1:3 mólarányok közötti) (Jürgens *et al.*, 2001.).

7. Összefoglalás

Az LPS (makro) molekulák fluoreszcens festékkel való kovalens jelölése révén mikrochip gélelektroforézis és mikrochip zónaelektroforézis módszereket dolgoztunk ki és alkalmaztunk számos S- és R-típusú baktériumból származó endotoxinok esetében.

Különböző enterobaktériumok (*E. coli*, *Salmonella*, *Proteus* nemzetségek valamint *Shigella sonnei* mutánsok) lipopoliszacharid molekuláinak szerkezeti jellemzésére és az endotoxin kivonatok komponenseinek jellemzésére és mennyiségi meghatározására módszert fejlesztettünk ki mikrochip gélelektroforézissel.

A Gram-negatív baktériumok S-endotoxin kivonat komponenseinek relatív mennyiségi meghatározásával és a tömegeloszlás analízissel szerkezeti típus szerinti osztályozást alakítottunk ki, mely lehetőséget nyújt molekulatömeg meghatározásra. Az általunk kidolgozott mikrochip gélelektroforetikus elválasztást sikeresen alkalmaztuk különböző enterobaktériumokból származó LPS molekulák kimutatására teljes sejt lizátumokból és degradált poliszacharidok kimutatására egyaránt. Megállapítható, hogy ez a technika egy új, standardizálható, gyors és érzékeny módszer az endotoxinok detektálására és az endotoxin kivonat komponensek relatív mennyiségi kiértékelésére.

ELISA teszttel kimutattuk három, rendszertanilag távolálló baktériumtörzs (*P. morganii* O34 (8662/64), *E. coli* O111 és *S. enterica sv. Adelaide* O35) szerológiai keresztkapcsolatát. Ezen baktériumokból származó LPS-ek O-antigén összetételét az általunk kifejlesztett GC-MS módszerrel meghatároztuk, és a keresztkapcsolatért felelős kolitóz jelenlétét mindhárom esetben kimutattuk.

Tanulmányoztuk az endotoxinok biológiai hatásának hátterét. Az endotoxinok a humán vörösvértest membránját rigidizálják, amely EPR spin-jelöléssel nyomon követhető. Kimutattuk endotoxinok és a hemoglobin alegységek kölcsönhatását mikrochip gélelektroforézis módszerrel.

Irodalomjegyzék

Agilent (2008) *Agilent high sensitivity protein 250 kit guide*.

Agilent (2013) *Agilent rna 6000 nano kit guide*.

Alam, J., Beyer, N. & Liu, H. W. (2004) Biosynthesis of colitose: Expression, purification, and mechanistic characterization of gdp-4-keto-6-deoxy-d-mannose-3-dehydrase (cold) and gdp-l-colitose synthase (colc). *Biochemistry,* 43(51)**,** 16450-16460.

Altria, K. D. (1999) Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A,* 856(1-2)**,** 443-463.

Bellary, S. S., Anderson, K. W., Arden, W. A. & Butterfield, D. A. (1994) Effect of lipopolysaccharide on the physical conformation of the erythrocyte cytoskeletal proteins. Life Sciences, 56(2), 91-98.

Berger, D. & Beger, H. G. (1987) Evidence for endotoxin binding-capacity of human gc-globulin and transferrin. *Clinica Chimica Acta,* 163(3)**,** 289-299.

Berger, D., Schleich, S., Seidelmann, M. & Beger, H. G. (1991) Demonstration of an interaction between transferrin and lipopolysaccharide - an invitro study. *European Surgical Research,* 23(5-6)**,** 309-316.

Beutin, L., Krause, G., Zimmermann, S., Kaulfuss, S. & Gleier, K. (2004) Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in germany over a 3-year period. *Journal of Clinical Microbiology,* 42(3)**,** 1099-1108.

Bousse, L., Mouradian, S., Minalla, A., Yee, H., Williams, K. & Dubrow, R. (2001) Protein sizing on a microchip. *Analytical Chemistry,* 73(6)**,** 1207-1212.

Brade, H., Brade, L. & Rietschel, E. T. (1988) Structure-activity-relationships of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) - current and future aspects. *Zentralblatt Fur Bakteriologie Mikrobiologie Und Hygiene Series a-Medical Microbiology Infectious Diseases Virology Parasitology,* 268(2)**,** 151-179.

Brandenburg, K., Mayer, H., Koch, M. H. J., Weckesser, J., Rietschel, E. T. & Seydel, U. (1993) Influence of the supramolecular structure of free lipid-a on its biological-activity. *European Journal of Biochemistry,* 218(2)**,** 555-563.

Brandenburg, K., Richter, W., Koch, M. H. J., Meyer, H. W. & Seydel, U. (1998) Characterization of the nonlamellar cubic and h-ii structures of lipid a from *Salmonella enterica serovar minnesota* by x-ray diffraction and freeze-fracture electron microscopy. *Chemistry and Physics of Lipids,* 91(1)**,** 53-69.

Brandenburg, K., Wagner, F., Müller, M., Heine, H., Andra, J., Koch, M. H. J., Zahringer, U. & Seydel, U. (2003) Physicochemical characterization and biological activity of a glycoglycerolipid from mycoplasma fermentans. *European Journal of Biochemistry,* 270(15)**,** 3271-3279.

Butterfield, D. A., Sun, B., Bellary, S., Arden, W. A. & Anderson, K. W. (1994) Effect of endotoxin on lipid order and motion in erythrocyte-membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease,* 1225(2)**,** 231-234.

Caroff, M. & Karibian, D. (2003) Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research,* 338(23)**,** 2431-2447.

Carr, C. & Morrison, D. C. (1984) Lipopolysaccharide interaction with rabbit erythrocyte-membranes. *Infection and Immunity,* 43(2)**,** 600-606.

Chovan, T. & Guttman, A. (2002) Microfabricated devices in biotechnology and biochemical processing. *Trends in Biotechnology,* 20(3)**,** 116-122.

Coburn, B., Grassl, G. A. & Finlay, B. B. (2007) *Salmonella,* the host and disease: A brief review. *Immunology and Cell Biology,* 85(2)**,** 112-118.

Currie, C. G. & Poxton, I. R. (1999) The lipopolysaccharide core type of *Escherichia coli* O157:H7 and other non-o157 verotoxin-producing *E. coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology,* 24(1)**,** 57-62.

Drzewiecka, D., Toukach, P. V., Arbatsky, N. P., Zych, K., Shashkov, A. S., Knirel, Y. A. & Sidorczyk, Z. (2002) Structure of the o-specific polysaccharide of *Proteus penneri* 103 containing ribitol and 2-aminoethanol phosphates. *Carbohydrate Research,* 337(17)**,** 1535-1540.

Freitag, R., Fix, M. & Bruggemann, O. (1997) Analysis of endotoxins by capillary electrophoresis. *Electrophoresis,* 18(10)**,** 1899-1905.

Galanos, C., Lüderitz, O. & Westphal, O. (1969) A new method for extraction of r-lipopolysaccharides. *European Journal of Biochemistry,* 9(2)**,** 245-&.

Gupta, R. K., Egan, W., Bryla, D. A., Robbins, J. B. & Szu, S. C. (1995) Comparative immunogenicity of conjugates composed of *Escherichia-coli* O111 O-specific polysaccharide, prepared by treatment with acetic-acid or hydrazine, bound to tetanus toxoid by 2 synthetic schemes. *Infection and Immunity,* 63(8)**,** 2805-2810.

Gáspár, A. (2000) *Kapilláris zónaelektroforézis,* (Debrecen, Kossuth Egyetemi Kiadó).

Gwozdzinski, K., Pieniazek, A. & Kaca, W. (2003) Lipopolysaccharide from proteus mirabilis o29 induces changes in red blood cell membrane lipids and proteins. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 35(3), 333-338.

Haishima, Y., Kondo, S. & Hisatsune, K. (1988) O-antigenic lipopolysaccharides isolated from a marine *Vibrio*, bio-serogroup-1875, possessing an antigenic factor in common with O1 *Vibrio cholerae. Journal of General Microbiology,* 134(1827-1833.

Hasiwa, N., Daneshian, M., Bruegger, P., Fennrich, S., Hochadel, A., Hoffmann, S., Rivera-Mariani, F. E., Rockel, C., Schindler, S., Spreitzer, I., Stoppelkamp, S., Vysyaraju, K. & Hartung, T. (2013) Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test. *Altex-Alternatives to Animal Experimentation,* 30(2)**,** 169-208.

Hitchcock, P. J. & Brown, T. M. (1983) Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Bacteriology,* 154(1)**,** 269-277.

Holst, O. (1999) *Chemical structure of the core region of lipopolysaccharides,* (New York, Marcel Dekker).

Holst, O., Ulmer, A. J., Brade, H., Flad, H. D. & Rietschel, E. T. (1996) Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *Fems Immunology and Medical Microbiology,* 16(2)**,** 83-104.

Hotchkiss, R. S. & Karl, I. E. (2003) Medical progress: The pathophysiology and treatment of sepsis. *New England Journal of Medicine,* 348(2)**,** 138-150.

Iversen, T. & Bundle, D. R. (1982) Synthesis of the colitose determinant of *Escherichia coli* O*111* and 3,6-di-o- (alpha-d-galactopyranosyl)-alpha-d-glucopyranoside. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie,* 60(3)**,** 299-303.

Jann, B., Shashkov, A. S., Hahne, M., Kochanowski, H. & Jann, K. (1994) Structure of the O83-specific polysaccharide of *Escherichia-coli* O83-K24-H31. *Carbohydrate Research,* 261(2)**,** 215-222.

Jann, K. & Jann, B. (1984) *Structure and biosynthesis of O antigens,* (Handbook of Endotoxin).

Jann, K. & Jann, B. (1987) Polysaccharide antigens of *Escherichia coli. Reviews of Infectious Diseases,* 9(S517-S526.

Jürgens, G., Müller, M., Koch, M. H. J. & Brandenburg, K. (2001) Interaction of hemoglobin with enterobacterial lipopolysaccharide and lipid A - physicochemical characterization and biological activity. *European Journal of Biochemistry,* 268(15)**,** 4233-4242.

Kaca, W., Roth, R. I. & Levin, J. (1994) Hemoglobin, a newly recognized lipopolysaccharide (lps)-binding protein that enhances lps biological-activity. *Journal of Biological Chemistry,* 269(40)**,** 25078-25084.

Kaca, W., Roth, R. I., Vandegriff, K. D., Chen, G. C., Kuypers, F. A., Winslow, R. M. & Levin, J. (1995) Effects of bacterial-endotoxin on human cross-linked and native hemoglobins. *Biochemistry,* 34(35)**,** 11176-11185.

Kadota, Y., Kamada, T., Yoshimura, N., Otsuji, S. (1992) Changes in erythrocyte membrane fluidity by endotoxin in rats. Journal of Anesthesia, 6(2), 145-152.

Karibian, D., Deprun, C. & Caroff, M. (1993) Comparison of lipids a of several *Salmonella* and *Escherichia* strains by cf-252 plasma desorption mass-spectrometry. *Journal of Bacteriology,* 175(10)**,** 2988-2993.

Kenne, L., Lindberg, B., Soderholm, E., Bundle, D. R. & Griffith, D. W. (1983) Structural studies of the O-antigens from *Salmonella greenside* and *Salmonella adelaide*. *Carbohydrate Research,* 111(2)**,** 289-296.

Kilár, A., Dörnyei, A., Bui, A., Szabó, Z., Kocsis, B. & Kilár, F. (2011) Structural variability of endotoxins from R-type isogenic mutants of *Shigella sonnei. Journal of Mass Spectrometry,* 46(1)**,** 61-70.

Kilár, A., Farkas, V., Kovács, K., Kocsis, B. & Kilár, F. (2008a) Novel quantitative electrophoretic analysis of endotoxins on microchips. *Electrophoresis,* 29(8)**,** 1713-1722.

Kilár, A., Kocsis, B., Kustos, I., Kilár, F. & Hjertén, S. (2006) CE to monitor endotoxins by protein complexation. *Electrophoresis,* 27(21)**,** 4188-4195.

Kilár, A., Péterfi, Z., Csorba, E., Kilár, F. & Kocsis, B. (2008b) Capillary electrophoresis chips for screening of endotoxin chemotypes from whole-cell lysates. *Journal of Chromatography A,* 1206(1)**,** 21-25.

Kocsis, B., Kilár, A., Makszin, L., Kovács, K. & Kilár, F. (2011a) Capillary electrophoresis chips for fingerprinting endotoxin chemotypes from whole-cell lysates, in: O. Holst (Ed.) *Microbial toxins: Methods and protocols.* pp. 89-99.

Kocsis, B., Kilár, A., Makszin, L., Kovács, K. & Kilár, F. (2011b) Capillary electrophoresis chips for fingerprinting endotoxin chemotypes from whole-cell lysates. *Microbial Toxins: Methods and Protocols,* 739(89-99.

Kontrohr, T. & Kocsis, B. (1981) Isolation of adenosine 5'-diphosphate-d-glycero-d-mannoheptose- an intermediate in lipopolysaccharide biosynthesis of *Shigella-sonnei. Journal of Biological Chemistry,* 256(15)**,** 7715-7718.

Kumada, H., Watanabe, K., Umemoto, T., Kato, K., Kondo, S. & Hisatsune, K. (1989) Chemical and biological properties of lipopolysaccharide, lipid-a and degraded polysaccharide from *Wolinella recta* ATCC 33238. *Journal of General Microbiology,* 135, 1017-1025.

Kustos, I., Kocsis, B., Kerepesi, I. & Kilár, F. (1998) Protein profile characterization of bacterial lysates by capillary electrophoresis. *Electrophoresis,* 19(13)**,** 2317-2323.

Li, S. F. Y. (1992) *Capillary electrophoresis, principles, practice and applications,* (Amsterdam, Journal of Chromatography Library).

Lu, C. Y., Tso, D. J., Yang, T., Jong, Y. J. & Wei, Y. H. (2002) Detection of dna mutations associated with mitochondrial diseases by Agilent 2100 bioanalyzer. *Clinica Chimica Acta,* 318(1-2)**,** 97-105.

Lüderitz, O., Freudenberg, M. A., Galanos, C., Lehmann, V., Rietschel, E. T. & Shaw, D. H. (1982) Lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. *Current Topics in Membranes and Transport,* 17(79-151.

Magalhaes, P. O., Lopes, A. M., Mazzola, P. G., Rangel-Yagui, C., Penna, T. C. V. & Pessoa, A. (2007) Methods of endotoxin removal from biological preparations: A review. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,* 10(3)**,** 388-404.

Makszin, L., Kilár, A., Felső, P., Péterfi, Z., Kocsis, B. & Kilár, F. (2012) Quantitative microfluidic analysis of S- and R-type endotoxin components with chip capillary electrophoresis. *Electrophoresis,* 33(22)**,** 3351-3360.

Makszin, L., Péterfi, Z., Blaskó, Á., Sándor, V., Kilár, A., Dörnyei, Á., Ősz, E., Kilár, F. & Kocsis, B. (2015) Structural background for serological cross-reactivity between bacteria of different enterobacterial serotypes. *Electrophoresis*.

Manzo, E., Molinaro, A., Bedini, E., De Castro, C. & Parrilli, M. (2001) A very efficient method to cleave lipid a and saccharide components in bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research,* 333(4)**,** 339-342.

Mason, R. P., Giavedoni, E. B. & Dalmasso, A. P. (1977) Complement-induced decrease in membrane mobility - introducing a more sensitive index of spin-label motion. *Biochemistry,* 16(6)**,** 1196-1201.

Molinaro, A., Silipo, A., De Castro, C., Sturiale, L., Nigro, G., Garozzo, D., Bernardini, M. L., Lanzetta, R. & Parrilli, M. (2008) Full structural characterization of *Shigella flexneri* m90t serotype 5 wild-type R-lps and its delta galu mutant: Glycine residue location in the inner core of the lipopolysaccharide. *Glycobiology,* 18(3)**,** 260-269.

Müller-Loennies, S., Brade, L. & Brade, H. (2007) Neutralizing and cross-reactive antibodies against enterobacterial lipopolysaccharide. *International Journal of Medical Microbiology,* 297(5)**,** 321-340.

Nishiuchi, Y., Doe, M., Hotta, H. & Kobayashi, K. (2000) Structure and serologic properties of O-specific polysaccharide from *Citrobacter freundii* possessing cross-reactivity with *Escherichia coli* O157 : H7. *Fems Immunology and Medical Microbiology,* 28(2)**,** 163-171.

Noda, K., Yamasaki, R., Hironaka, Y. & Kitagawa, A. (2001) Selection of peptides that bind to the core oligosaccharide of r-form lps from a phage-displayed heptapeptide library. *Fems Microbiology Letters,* 205(2)**,** 349-354.

Obrien, T. F. (1992) Global surveillance of antibiotic-resistance. *New England Journal of Medicine,* 326(5)**,** 339-340.

Oda, R. P. & Landers, J. P. (1997) *Handbook of capillary electrophoresis,* (Second edn) (USA, CRC Press, Boca Raton, FL).

Osborn, M. J., Gander, J. E., Parisi, E. & Carson, J. (1972) Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium. J. Biol. Chem.,* 247(3962-3972.

Perepelov, A. V., Liu, B., Senchenkova, S. N., Shashkov, A. S., Feng, L., Knirel, Y. A. & Wang, L. (2008a) Structure of the O-polysaccharide of *Escherichia coli* O112ab containing l-iduronic acid. *Carbohydrate Research,* 343(3)**,** 571-575.

Perepelov, A. V., Shevelev, S. D., Liu, B., Senchenkova, S. N., Shashkov, A. S., Feng, L., Knirel, Y. A. & Wang, L. (2010) Structures of the O-antigens of *Escherichia coli* O13, O129, and O135 related to the O-antigens of *Shigella flexneri. Carbohydrate Research,* 345(11)**,** 1594-1599.

Perepelov, A. V., Weintraub, A., Liu, B., Senchenkova, S. N., Shashkov, A. S., Feng, L., Wang, L., Widmalm, G. & Knirel, Y. A. (2008b) The O-polysaccharide of *Escherichia coli* O112ac has the same structure as that of *Shigella dysenteriae* type 2 but is devoid of O-acetylation: A revision of the *S. dysenteriae* type 2 O-polysaccharide structure. *Carbohydrate Research,* 343(5)**,** 977-981.

Poinsot, V., Carpéné, M. A. & Couderc, F. (2012) *Coupled mass spectrometric strategies for the determination of carbohydrates at very low concentrations: The case of*

polysaccharides involved in the molecular dialogue between plants and rhizobia, (InTech).

Poppe, H. (1998) Theory of capillary zone electrophoresis. *Advances in Chromatography, Vol 38: a Tribute to J. Calvin Giddings,* 38(233-300.

Péterfi, Z. & Kocsis, B. (2000) Comparison of blocking agents for an ELISA for LPS. *Journal of Immunoassay,* 21(4)**,** 341-354.

Péterfi, Z., Kustos, I., Kilár, F. & Kocsis, B. (2007) Microfluidic chip analysis of outer membrane proteins responsible for serological cross-reaction between three gram-negative bacteria: *Proteus morganii* O34, *Escherichia coli* O111 and *Salmonella adelaide* O35. *Journal of Chromatography A,* 1155(2)**,** 214-217.

Rabbi, F., Sultana, N., Rahman, T., Al-Emran, H. M., Uddin, M. N., Hossain, M., Anwar, K. S., Yasmin, M., Nessa, J. & Ahsan, C. R. (2008) Analysis of immune responses and serological cross reactivities among *Vibrio cholerae* O1, *Shigella flexneri* 2a and *Haemophilus influenzae* b. *Cellular & Molecular Immunology,* 5(5)**,** 393-396.

Ralovich, B. & Vörös, S. (1967) *Morganella morganii* antigenetically related to *Escherichia coli* O111 : K58(b4). *Acta microbial Acad Sci Hung.,* 14(189-194.

Rauss, K. & Vörös, S. (1967) Antigenic relationships between *Morganella morganii* and different genera of *Enterobacteriaceae*. *Acta microbial Acad Sci Hung.,* 14(199-204.

Ren, Y., Liu, B., Cheng, J. S., Liu, F. X., Feng, L. & Wang, L. (2008) Characterization of *Escherichia coli* O3 and O21 O-antigen gene clusters and development of serogroup-specific pcr assays. *Journal of Microbiological Methods,* 75(2)**,** 329-334.

Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Zahringer, U., Seydel, U., Dipadova, F., Schreier, M. & Brade, H. (1994) Bacterial endotoxin - molecular relationships of structure to activity and function. *Faseb Journal,* 8(2)**,** 217-225.

Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Ulmer, A. J., Holst, O., Brade, H., Schmidt, G., Mamat, U., Grimmecke, H. D., Kusumoto, S. & Zahringer, U. (1993) The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology,* 187(3-5)**,** 169-190.

Rónai, Z., Sasvári-Székely, M., Chován, T. & Guttman, A. (2002) Elektroforetikus mikrochipek alkalmazása gyors dns-analízisre. *Biokémia,* 26(2)**,** 26-32.

Roth, R. I., Levin, F. C. & Levin, J. (1993) Distribution of bacterial-endotoxin in human and rabbit-blood and effects of stroma-free hemoglobin. Infection and Immunity, 61(8), 3209-3215.

Samuel, G., Hogbin, J. P., Wang, L. & Reeves, P. R. (2004) Relationships of the *Escherichia coli* O157, O111, and O55 O-antigen gene clusters with those of *Salmonella enterica* and *Citrobacter freundii,* which express identical O antigens. *Journal of Bacteriology,* 186(19)**,** 6536-6543.

Sawardeker, J. S. & Sloneker, J. H. (1965) Quantitative determination of monosaccharides by gas liquid chromatography. *Analytical Chemistry,* 37(7)**,** 945-947.

Schlichting, E., Aspelin, T. & Lyberg, T. (1996) Interactions of endotoxin with human blood cells and serum proteins. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation,* 56(2)**,** 167-176.

Schumann, R. R., Leong, S. R., Flaggs, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., Tobias, P. S. & Ulevitch, R. J. (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding-protein. *Science,* 249(4975)**,** 1429-1431.

Silipo, A., Lanzetta, R., Amoresano, A., Parrilli, M. & Molinaro, A. (2002) Ammonium hydroxide hydrolysis: A valuable support in the MALDI-TOF mass spectrometry analysis of lipid A fatty acid distribution. *Journal of Lipid Research,* 43(12)**,** 2188-2195.

Tsai, C. M. & Frasch, C. E. (1982) A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrilamide gels. *Analytical Biochemistry,* 119(1)**,** 115-119.

Ulmer, A. J., Rietschel, E. T., Zahringer, U. & Heine, H. (2002) Lipopolysaccharide: Structure, bioactivity, receptors, and signal transduction. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology,* 14(76)**,** 53-68.

Vinogradov, E. (2002) Structure of the O-specific polysaccharide chain of the lipopolysaccharide of *Bordetella hinzii. Carbohydrate Research,* 337(10)**,** 961-963.

Vukajlovich, S. W., Hoffman, J. & Morrison, D. C. (1987) Activation of human-serum complement by bacterial lipopolipolysaccharides - structural requirements for antibody independent activation of the classical and alternative pathways. *Molecular Immunology,* 24(4)**,** 319-331.

Wang, L. & Reeves, P. R. (2000) The *Escherichia coli* O111 and *Salmonella enterica* O35 gene clusters: Gene clusters encoding the same colitose-containing O antigen are highly conserved. *Journal of Bacteriology,* 182(18)**,** 5256-5261.

Wang, R., Chen, L., Cotter, R. J., Qureshi, N. & Takayama, K. (1992) Fragmentation of lipopolysaccharide anchors in plasma desorption mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods,* 15(3)**,** 151-166.

Westphal, O., Lüderitz, O. & Bister, F. (1952) Über die extraktion von bakterien mit phenol/wasser. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section B-a Journal of Chemical Sciences,* 7(3)**,** 148-155.

Megjelent közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

1. Béla Kocsis, Anikó Kilár, **Lilla Makszin**, Krisztina Kovács, Ferenc Kilár: Capillary electrophoresis chips for fingerprinting endotoxin chemotypes from whole-cell lysates, *Microbial Toxins: Methods and Protocols,* 89-99, 2011

2. **Lilla Makszin**, Anikó Kilár, Péter Felső, Zoltán Péterfi, Béla Kocsis, Ferenc Kilár: Quantitative microfluidic analysis of S- and R-type endotoxin components with chip capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 2012, 33, 3351–3360. **IF.: 3,261**

3. **Lilla Makszin**, Zoltán Péterfi, Ágnes Blaskó, Viktor Sándor, Anikó Kilár, Ágnes Dörnyei, Erzsébet Ősz, Ferenc Kilár, Béla Kocsis: Structural background for serological cross-reactivity between bacteria of different enterobacterial serotypes, *Electrophoresis* 2015, 36, 1336-1343. **IF: 3,161***

***** a még nem ismert impakt faktorú folyóiratok esetében az előző évi impakt faktor

Az értekezés témájában készült nem referált konferencia absztraktok

1. **Makszin Lilla**, Kilár Anikó, Kocsis Béla, Kilár Ferenc: Bakteriális endotoxinok gyors és érzékeny microchip elektroforetikus kimutatása, Elválasztástudományi Vándorgyűlés, 2008. november 5-7., Sárvár, Magyarország.

2. **Lilla Makszin**, Anikó Kilár, Annamária Bui, Zoltán Szabó, Ágnes Dörnyei, Viktor Farkas, Béla Kocsis, Ferenc Kilár: Fast and extremely sensitive detection of bacterial endotoxins in microchip electrophoresis, 23rd International Symposium on MicroScale Bioseparations, February 1-5, 2009, Boston, USA.

3. **Lilla Makszin**, Anikó Kilár, Krisztina Kovács, Béla Kocsis, Ferenc Kilár: Microchip electrophoresis for fingerprinting endotoxin chemotypes from whole-cell lysates, 6th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, November 6-7, 2009, Pécs, Hungary

4. **Lilla Makszin**, Anikó Kilár, Krisztina Kovács, Béla Kocsis, Ferenc Kilár: Microchip electrophoresis for fingerprinting endotoxin chemotypes from whole-cell lysates, 25th International Symposium on MicroScale Bioseparations, March 21-25, 2010, Prague, Czech Republic.

5. **Lilla Makszin**, Anikó Kilár, Péter Felső, Krisztina Kovács, Béla Kocsis, Ferenc Kilár: Endotoxins with highly sensitive microfluidic CE analysis, 10th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, July 7-14, 2010, Zagreb, Croatia.

6. **Lilla Makszin**, Anikó Kilár, Péter Felső, Béla Kocsis, Ferenc Kilár: Endotoxins with highly sensitive microfluidic CE analysis, 7th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, October 14-16, 2010, Pécs, Hungary

7. **Makszin Lilla**, Kilár Anikó, Felső Péter, Kocsi Béla, Kilár Ferenc: Pseudomonas törzsek vizsgálata mikrochip elektroforézis módszerrel, Elválasztástudományi Vándorgyűlés, 2010. november 10-12., Tapolca, Magyarország.

8. Ferenc Kilár, **Lilla Makszin**, Anikó Kilár, Ágnes Dörnyei, Béla Kocsis: Lipopolysaccharidomics, new field in microfluidic analysis, 26th International Symposium on MicroScale Bioseparations, May 1-5, 2011, San Diego, USA

9. **Lilla Makszin**, Anikó Kilár, Péter Felső, Zoltán Péterfi, Béla Kocsis, Ferenc Kilár: Quantitative analysis of S- and R-type endotoxin components with chip capillary electrophoresis, 27th International Symposium on MicroScale Bioseparations and Analyses, February 12-15, 2012, Geneva, Switzerland.

10. **Makszin Lilla**, Kilár Anikó, Felső Péter, Péterfi Zoltán, Kocsis Béla, Kilár Ferenc: S- és R-típusú endotoxin komponensek mennyiségi meghatározása microchip elektroforézissel, Elválasztástudományi Vándorgyűlés, 2012. november 7-9., Hajdúszoboszló, Magyarország

11. Blaskó Ágnes, **Makszin Lilla**, Bui Annamária, Kocsis Béla, Kilár Ferenc: Bakteriális endotoxinok vizsgálata mikrochip elektroforézissel és GC-MS módszerekkel, Elválasztástudományi Vándorgyűlés, 2012. november 7-9., Hajdúszoboszló, Magyarország

12. Tamás Kiss, **Lilla Makszin**, Ágnes Blaskó, Victor U. Weiss, Ferenc Kilár: Zone electrophoresis on microchip for biomolecules, 10th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, April 25-27, 2013, Pécs, Hungary

13. **Lilla Makszin**, Ágnes Blaskó, Tamás Kiss, Victor U. Weiss, Ferenc Kilár: Zone electrophoresis on microchip, 13th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 27th of June and 7th of July, 2013, Debrecen, Hungary

14. **Lilla Makszin**, Ágnes Blaskó, Pál Gróf, Ferenc Kilár, Béla Kocsis: Endotoxin detection by microchip electrophoresis and EPR in blood, ITP 2013 - 20th International Symposium on Electro- and Liquid Phase- Separation Techniques, October 6-9, 2013, Tenerife, Canary Islands (Spain)

15. **Lilla Makszin**, Ágnes Blaskó, Zoltán Péterfi, Zoltán Berente, Ferenc Kilár, Béla Kocsis: Structure of colitose-containing O-polysaccharides from the lipopolysaccharides of *Proteus morganii* O34 (8662/64), *Escherichia coli* O111 and *Salmonella enterica sv. Adelaide* O35, 30th International Symposium on MicroScale Bioseparations, 27 April - 1 May, 2014, Pécs, Hungary

Előadások:

1. Dörnyei Ágnes, Kilár Anikó, **Makszin Lilla**, Szabó Zoltán, Kocsis Béla, Kilár Ferenc: Bakteriális endotoxinok tömegspektrometriás jellemzése, 2010. április 6., Pécs, PAB Székház
2. Kilár Anikó, **Makszin Lilla**, Kocsis Béla, Kilár Ferenc: Lipopoliszacharidomika - mikrofluidikával, XLII. Kromatográfiás Továbbképző Tanfolyam, 2011. január 25-27., Szeged, Magyarország
3. Anikó Kilár, **Lilla Makszin**, Ágnes Dörnyei, Béla Kocsis, Ferenc Kilár: Structural Analysis of Endotoxins by Microchip and Mass Spectrometry, 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, June 19-23, 2011, Budapest, Hungary
4. Anikó Kilár, Ágnes Dörnyei, Viktor Sándor, **Lilla Makszin**, Béla Kocsis, Ferenc Kilár: Mass Spectrometry and Chip Electrophoresis applied to Lipopolysaccharidomics, 12th Symposium and Summer School on Bioanalysis, July 4-14, 2012, Cluj-Napoca, Romania
5. Ferenc Kilár, **Lilla Makszin**, Anikó Kilár, Ágnes Dörnyei, Viktor Sándor, Béla Kocsis: Lipopolysaccharidomics – The emerging challenge in separation science, 28th International Symposium on Microscale Bioseparations and Analyses, October 21-24, 2012, Shanghai, China
6. Kilár Anikó, Dörnyei Ágnes, Sándor Viktor, **Makszin Lilla**, Kilár Ferenc, Kocsis Béla: Lipopoliszacharidomika on-line és off-line kapcsolt technikákkal, Elválasztástudományi Vándorgyűlés, 2012. november 7-9., Hajdúszoboszló, Magyarország
7. **Makszin Lilla**, Kilár Ferenc, Kocsis Béla: Endotoxinok vizsgálata mikrochip elektroforézissel, XLIII. Kromatográfiás Továbbképző Tanfolyam, 2013. január 28-30., Szeged, Magyarország
8. Anikó Kilár, Ágnes Dörnyei, Viktor Sándor, **Lilla Makszin**, Ágnes Blaskó, Béla Kocsis, Ferenc Kilár: Lipopolysaccharidomics – A complex approach, 10th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, April 25-27, 2013, Pécs, Hungary
9. Kilár Ferenc, **Makszin Lilla**, Kilár Anikó, Dörnyei Ágnes, Sándor Viktor, Kocsis Béla: Lipopoliszacharidomika, XIX. Nemzetközi Vegyészkonferencia, 2013.november 21-24., Kolozsvár, Románia
10. Ferenc Kilár, **Lilla Makszin**, Anikó Kilár, Ágnes Dörnyei, Viktor Sándor, Béla Kocsis: Challenges and solutions in the structure elucidation of lipolysaccharides, Nordic Separation Science Society 7th Conference, June 9-12, 2014, Stockholm, Sweden

11. **Makszin Lilla**, Péterfi Zoltán, Blaskó Ágnes, Sándor Viktor, Kilár Anikó, Dörnyei Ágnes, Ősz Erzsébet, Kilár Ferenc, Kocsis Béla: Bélbaktériumok szerológiai keresztkapcsolatának szerkezeti háttere, Elválasztástudományi Vándorgyűlés, 2014. november 12-14, Egerszalók, Magyarország

Az értekezés témáján kívül készült nem referált konferencia absztraktok

1. Ágnes Dorn, Györgyi Horváth, **Lilla Makszin**, Anikó Kilár, Péter Felső, Ferenc Kilár, Levente Emődy, György Schneider: The effect of the rosemary extractions on the growth of the Enterohaemorragic *Escherichia coli* (SAKAI, EDL 933) and *Escherichia coli* (MG 1655), A Magyar Mikrobiológiai Társaság XVI. Nemzetközi Konferenciája, 2011. július 20-22., Budapest, Magyarország
2. Ágnes Dorn, **Lilla Makszin**, Györgyi Horváth, Ferenc Kilár, György Schneider: Protein profile changes, induced by the herbal extract rosemary in the *Enterohemorrhagic Escherichia coli* strain EDL933, II International Conference on Antimicrobial Research, November 21-23, 2012, Lisbon, Portugal
3. Tea Perkov, Jasmina Rokov-Plavec, **Lilla Makszin**, Ferenc Kilár: Microchip capillary electrophoresis in expression profiling of circulating tumor cells from cancer patients, 10th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, April 25-27, 2013, Pécs, Hungary

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőimnek **Prof. Dr. Kilár Ferenc** egyetemi tanárnak és **Dr. Kocsis Béla** egyetemi docensnek, hogy hosszú évek során, kitartóan segítettek a kutatási munkában; ötleteikkel, javaslataikkal támogattak.

Külön köszönöm Dr. Kilár Ferencnek, hogy lehetővé tette a Pécsi Tudományegyetem Kémia Doktori Iskolájában dolgozatom elkészítését.

Köszönettel tartozom **Dr. Kilár Anikónak**, aki ezen a kutatási vonalon elindított és később is figyelemmel kísérte munkámat, észrevételeivel, javaslataival segítségemre volt.

Hálás köszönettel tartozom **Dr. Fathiné Dr. Blaskó Ágnesnek** a közösen végzett munkáért, a szakirodalom tanulmányozásában és a dolgozat átnézésében nyújtott segítségéért.

Köszönöm **Dr. Kocsis Bélánénak** a mikrobiológiai minták előkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönöm továbbá **Dr. Péterfi Zoltánnak**, **Dr. Bouquet Orsolyának**, **Dr. Bui Annamáriának**, **Fenyvesiné Dr. Páger Csillának**, **Dr. Csóka Balázsnak**, **Dr. Bufa Anitának**, **Dr. Poór Viktóriának** a közös munkát, szakmai segítségüket és baráti tanácsaikat, amelyek mind hozzájárultak disszertációm még teljesebbé tételéhez.

Külön köszönöm Ph.D társaimnak: **Felső Péternek**, **Sándor Viktornak, Kőnigné Péter Anikónak** és **Nagy Laurának**, akik támogattak és biztattak munkám során.

Köszönet illeti a PTE ÁOK Bioanalitikai Intézet, a PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológia és Immunitástani Intézet, valamint a PTE TTK Analitikai és Környezeti Kémia Tanszék valamennyi munkatársát és doktoranduszát a munkámhoz nyújtott szakmai segítségükért és támogatásukért.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak azt a sok támogatást és biztatást, amelyet tanulmányaim és munkám során nyújtottak.