

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

**Bakteriális endotoxinok jellemzése chip technikával,
szerkezet és immunfunkció kapcsolata**

PhD értekezés tézisei

Makszin Lilla

Témavezetők:

Dr. Kilár Ferenc

egyetemi tanár

Dr. Kocsis Béla

egyetemi docens



PÉCS

2015

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. 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 szepszikus sokk kialakulásához vezethet megrövidített idő alatt.

Az egyik probléma a szepszises esetek gyógyításával az, hogy nehéz azonosítani a fertőzésért felelős kórokozót, így a széles spektrumú antibiotikum kezelésén 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. Egészségügyi- és üzleti érdek is, hogy a bakteriális fertőzést, ezen belül is az eszközök és gyógyszerek endotoxinnal történő szennyezését megelőzzék. Fontos minőségi követelmény, hogy az alkalmazott injektálható gyógyszerek, sebészeti eszközök, folyadékok, dializáló csövek sterilnek 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 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. morgani* 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 kólitózt 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.

3 Anyagok és módszerek

3.1 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 vad típus, 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.

3.2 Endotoxinok, lipid A, O-antigének

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

3.3 Oszlopkromatográfia

Az LPS-eket 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.

3.4 Endotoxinok kinyerése baktérium sejtlizátumából

A baktériumok tenyésztése (egy homogén telepéből) 5 ml Müller-Hinton bouillonban történt. 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). 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 sejtfa felbomlott. Termosztátba raktuk 30 percre 37°C-ra. A baktérium szuszpenzióhoz hozzáadtunk 200 µl lízis puffert, ami kiszabadítja a többi sejtalkotót (fehérjéket, endotoxinokat, nukleinsavat és egyéb sejtörmelékeket). 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 sejtfa alkotóit. A reakcióelegyhez 800 µl etanolban oldott MgCl₂-t adtunk (3,8 mg MgCl₂ * 6 H₂O + 50 ml etanol). A keveréket -20°C-on 1 éjszakán át

állni hagyjuk. 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 μ l PBS-el. A mintákat 5 percig ultrahangos fürdőbe helyeztük. Ezt a fehérjementes LPS tartalmú mintát használtuk fel a további mérésekhez.

3.5 Mikrochip gélelektroforézis módszerfejlesztés

A mikrochip elektroforézis méréshez High Sensitivity Protein 250 LabChip kitet használtunk (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). A mikrochip elektroforetikus futtatásokat Agilent Bioanalyzer 2100 típusú készülékkel végeztük lézerindukált fluoreszcencia detektort (630 gerjesztési és 650 nm elnyelési hullámhosszak) alkalmazva. Ezek a chipok 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 μ l tízszeresen hígított fluoreszcens festékoldatot adtunk 5 μ l 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 μ l etanolamin hozzáadásával állítottuk le a felesleges festéket megkötve (ez a festék+etanolamin komplex adja minden mintánál a rendszeres csúcsot, ami belső standardnak tekinthető). A fluoreszcensen jelölt mintákat ötszörösére hígítottuk 24 μ l desztillált víz hozzáadásával. A hígított minták 4 μ l-éhez 2 μ l 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 μ l szeparáló géllal (poli-dimetil-akrilamid alapú lineáris polimer oldat), mely lecsökkenti az elektrooszmotikus áramlást (EOF-t). Ezután 12 μ l 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 μ l kovalensen jelölt endotoxin mintákkal.

Az endotoxin minták futtatásához a Bioanalyzer 2100 program a következőképpen került átdolgozásra: az injektálás elektroforetikusán 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 30°C-ra

állítottuk be. Az elektroferogramok minőségi és mennyiségi kiértékelését a 2100 Expert szoftver segítségével végeztük el. A mintákat háromszor mértük le ugyanazon és/vagy különböző mikrochipeken, ellenőrizve a mérések ismételtetését illetve a csúcspozíció, csúcshatóterek és csúcs alatti területek reprodukálhatóságát.

3.6 ELISA

Immunológiai keresztreakciók igazolására ELISA tesztek alkalmaztunk. A tesztek baktériumokból származó intakt LPS, vagy DPS vagy lipid A minták és nyúlban előállított immunszérum közötti szerológiai reakción alapulnak: kezeletlen és hővel előlt baktérium által kimerített antiszérummal dolgoztunk. A keresztreakciót kecskében termelt anti-nyúl-IgG-hez kötött o-fenilén diamín 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 előlt *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”) savóhoz centrifugálást (6000 x g, 20 perc) követően (felülúszó). Az üledék tartalmazta a baktériumsejtekhez kötött antitesteket.

3.7 Gázkromatográfia – tömegspektrometria

A gázkromatográfias méréshez a vizsgálandó LPS cukor-összetevőket alditól acetáttá alakítottuk a Sawardeker és Sloneker által kidolgozott metodika szerint.

A DPS mintákat 1 M H₂SO₄-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 gázkromatográfából (6890N) és egy quadropole 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 mm] 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 ionforrása 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.

3.8 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 *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) meghatározása bizonyult a legmegfelelőbbnek, melyet a spektrum alacsonyterű szélsőértékénél vettünk figyelembe. Ennek csökkenése a membrán-fluiditás csökkenését mutatja.

4 Eredmények és következtetések

4.1 Mikrochip gélelektroforézis módszerfejlesztés lipopoliszacharidok szerkezeti jellemzésére

Az általunk újonnan kidolgozott gyors és a korábbinál érzékenyebb MGE módszer fluoreszcens festékekkel 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. Módszerünket az eredetileg fehérjék vizsgálatára tervezett *High Sensitivity Protein 250 LabChip* kit rendszer elválasztási körülményeinek átdolgozásával fejlesztettük ki. Ennek során a következő paramétereket optimalizáltuk: *(i)* A fluoreszcens festék mennyiségét csökkentettük oly módon, hogy a gyors mozgékonyaságú lipid A + core egység jelintenzitását az elektroferogramokon elsőként megjelenő nagy intenzitású fluoreszcens festék+etanolamin komplexből álló rendszerűcs ne fedje el. *(ii)* 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. *(iii)* A fluoreszcens festék-endotoxin komplexek koncentrációját optimalizáltuk a legjobb felbontóképesség elérése érdekében. *(iv)* 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.

Az elválasztás során a fluoreszcens festékekkel 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.

4.1.1 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.

A molekulaméret alapján történő elválasztás az aggregálódás megakadályozása során felhasznált SDS-nek köszönhető. 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 *I. 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 mozgékonyak.

Ezek alapján az *E. coli* O83 és O112 baktériumokból származó endotoxin molekulákat az *I.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. Hasonló a profiljuk az *I.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, azzal a különbséggel, hogy az LPS komponensek vándorlása maximum 58 másodpercet vesz igénybe, ami az *I.a csoportéhoz* képest relatíve lassabb vándorlás. Az *I.c csoportba* tartozó *P. penneri* 105, *S. enterica* sv. *Minnesota* vad típus, *S. enterica* sv. *Adelaide* O35 és a *S. enterica* sv. *Urbana* O30 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. A *2. csoportba* tartozó *P. morgani* O34, 352 és 1594 baktériumokból származó endotoxinoknál a komponensek relatív mennyisége folyamatosan csökken a vándorlási idővel (molekulatömeggel, O-oligoszacharid oldallánc méretével).

A tisztított R-típusú *S. enterica* sv. *Minnesota* R595, *S. sonnei* R41, 4303 (fázis II) és *E. coli* D31 törzsekből származó endotoxinok elektroforetikus profiljaiban 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.

Meghatároztuk a kimutatási határt a vizsgált tisztított LPS mintáknál. Az S-típusú endotoxinok esetében a kimutatási határ a legnagyobb mennyiségben jelenlévő komponenst tekintve 0,43 ng/μl, a legkisebb mennyiségben jelenlévő komponenst tekintve 1,01 ng/μl. Az egy LPS komponenssel rendelkező R-típusú *S. enterica* sv. *Minnesota* R595 esetében a kimutatási határ 1,13 ng/μl volt.

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.

4.1.2 Sejtlizátumok vizsgálata

Az újonnan kidolgozott MGE módszerrel sikeresen detektáltunk egyetlen baktériumtelepből származó sejtenyészetből, enzimatis eljárással kivont endotoxin keverék komponenseket is. Az endotoxinok elektroferogramjából egyértelműen el lehet dönteni az LPS-ek típusát, azaz hogy S vagy R-típusú baktériumból származott-e a minta. A vártak 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. Ez azt igazolja, hogy a baktériumok sejtlizátumaiból nyert fehérjementes LPS minták minden további tisztítás nélkül, közvetlenül vizsgálhatók a kifejlesztett MGE módszerünkkel. Ezzel az eljárással az endotoxinok detektálási ideje jelentősen lerövidíthető, emellett a módszer jól reprodukálható, kevésbé idő- és anyagigényes.

4.1.3 LPS kivonat komponensek molekulatömegének meghatározása

A mikrochip elektroforézis technika, ugyanúgy, mint az SDS-PAGE módszer, megfelelő molekulatömeg standard hiányában nem lehetséges a molekulatömeg meghatározás az endotoxin komponensekre vonatkozóan. 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 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 endotoxinok jellemzésekor a szerkezet lényegesen befolyásolja az elektroforetikus vándorlást.

4.1.4 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, hidrolízátlan LPS-nek felel meg, 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.

4.2 Szerológiai keresztkapcsolatok és szerkezeti hátterük vizsgálata

4.2.1 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-eket, degradált poliszacharidokat és lipid A-kat használtuk, majd inkubáltuk a baktériumok ellen nyulakban termeltetett kezeletlen antiszérummal és ezzel párhuzamosan a különböző antigénekkal kimerített, például hővel előlt teljes baktériummal kezelt savókkal is. 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 (OD₄₉₂ 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.

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

4.2.2 O-poliszacharidok GC-MS vizsgálata

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. A hidrolizált O-poliszacharidok monoszacharid tartalmát alditol-acetát származék formájában vizsgáltuk az általunk kifejlesztett, diagnosztikailag is alkalmazható gázkromatográfia–tömegspektrometria kapcsolt módszerrel. A gázkromatográfias spektrum alapján mindhárom O-poliszacharid hasonló monoszacharidokból épül fel, azaz tartalmaz D-glükózt, D-galaktózt, glükózamint és kolutózt (3,6-dideoxi-L-galaktóz). A D-glükóz, D-galaktóz és glükózamin molaránya 1:1:1. Úgy gondoljuk, hogy a természetben ritkán előforduló kolutóz fontos szerepet játszik a vizsgált baktériumtörzsek közti keresztreakció kialakulásában.

4.3 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 mozgékonyására jellemző HWHH (*half-width at half-height*) értékek kisebbek a kontroll-minták esetén kapott értékeknél.

Azzal, hogy megváltozik a lipid kettősréteg szerkezete, az ionok és metabolitok permeabilitása, a membrán enzimkötődés aktivitása és a hormon receptorok tulajdonsága is megváltozik. 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

Vizsgáltuk az *E. coli* O83 baktériumból származó endotoxinok humán hemoglobinnal való kölcsönhatását.

5 Tézispontok

1. 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, az LPS (makro) molekulák fluoreszcens festékkel való kovalens jelölése révén.

2. 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.

3. 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.

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

5. 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

6 Köszönetnyilvánítás

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

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

Köszönettel tartozom **Dr. Kilar 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, Kónigné 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.

7 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***

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., Sárovar, 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**, Kilar Anikó, Felső Péter, Péterfi Zoltán, Kocsis Béla, Kilar 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, Kilar 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 Kilar: 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 Kilar: 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 Kilar, 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 Kilar, Béla Kocsis: Structure of colitose-containing O-polysaccharides from the lipopolysaccharides of *Proteus morgani* 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, Kilar Anikó, **Makszin Lilla**, Szabó Zoltán, Kocsis Béla, Kilar Ferenc: Bakteriális endotoxinok tömegspektrometriás jellemzése, 2010. április 6., Pécs, PAB Székház

2. Kilar Anikó, **Makszin Lilla**, Kocsis Béla, Kilar Ferenc: Lipopoliszacharidomika - mikrofluidikával, XLII. Kromatográfias Továbbképző Tanfolyam, 2011. január 25-27., Szeged, Magyarország

3. Anikó Kilar, **Lilla Makszin**, Ágnes Dörnyei, Béla Kocsis, Ferenc Kilar: 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 Kilar, Ágnes Dörnyei, Viktor Sándor, **Lilla Makszin**, Béla Kocsis, Ferenc Kilar: Mass Spectrometry and Chip Electrophoresis applied to Lipopolysaccharidomics, 12th Symposium and Summer School on Bioanalysis, July 4-14, 2012, Cluj-Napoca, Romania

5. Ferenc Kilar, **Lilla Makszin**, Anikó Kilar, 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. Kilar Anikó, Dörnyei Ágnes, Sándor Viktor, **Makszin Lilla**, Kilar Ferenc, Kocsis Béla: Lipopoliszacharidomika on-line és off-line kapcsolt technikákkal, Elválasztástudományi Vándorgyűlés, 2012. november 7-9., Hajdúszoboszló, Magyarország

7. **Makszin Lilla**, Kilar Ferenc, Kocsis Béla: Endotoxinok vizsgálata mikrochip elektroforézissel, XLIII. Kromatográfias Továbbképző Tanfolyam, 2013. január 28-30., Szeged, Magyarország
8. Anikó Kilar, Ágnes Dörnyei, Viktor Sándor, **Lilla Makszin**, Ágnes Blaskó, Béla Kocsis, Ferenc Kilar: Lipopolysaccharidomics – A complex approach, 10th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, April 25-27, 2013, Pécs, Hungary
9. Kilar Ferenc, **Makszin Lilla**, Kilar Anikó, Dörnyei Ágnes, Sándor Viktor, Kocsis Béla: Lipopoliszacharidomika, XIX. Nemzetközi Vegyészkonferencia, 2013.november 21-24., Kolozsvár, Románia
10. Ferenc Kilar, **Lilla Makszin**, Anikó Kilar, 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, Kilar Anikó, Dörnyei Ágnes, Ósz Erzsébet, Kilar 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 Kilar, Péter Felső, Ferenc Kilar, Levente Emődy, György Schneider: The effect of the rosemary extractions on the growth of the Enterohaemorrhagic *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 Kilar, 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 Kilar: 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