

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**

**Kémia Doktori Iskola**

**Bakteriális endotoxinok szerkezeti jellemzői**

**PhD értekezés tézisei**

**Annamária Bui**

**Témavezetők:**

**Prof. Dr. Kilar Ferenc**

**Dr. Kocsis Béla**



**2012**

## Bevezetés

A bakteriális endotoxinok (más néven lipopoliszacharidok vagy LPSs) szerkezeti összetétele rendkívül fontos élettani hatásuk szempontjából. Az endotoxinok hőstabil, nemfehérje természetű, immunogén vegyületek, melyek toxoidokká nem alakíthatók. A Gram-negatív bakteriális sejtfal külső membránjának alkotórészei. A lipopoliszacharidok három jól elkülönülő részre oszthatók, nevezetesen: a lipid A, a mag (core) és az O-specifikus oldallánc.

A **lipid A** rész egy a sejt belseje felé irányuló hidrofób struktúra, amely a toxikus biológiai hatásért felelős. Konzervatív felépítésű, általában egy zsírsav láncokkal acilált biszfoszforilált diszacharid. A **mag** rész köti össze a lipid A-t és az O-specifikus oldalláncot, és két alegységre osztható: *belső mag* és *külső mag*. A *belső mag*, melynek összetétele azonos az összes Gram-negatív baktériumnál, ritkán előforduló komponenseket tartalmaz (heptóz és 3-deoxi-D-manno-2-oktulonsav (Kdo)). A *külső mag* legfeljebb hat hexóz összetevőből áll.

Az LPS struktúra legkülső eleme a hidrofil **O-specifikus oldallánc**, ami 1-40 ismétlődő, változatos összetételű alegységből (amely 2-7 cukor összetevőből áll) épül fel. Az ismétlődő alegységek baktériumfajra jellemzőek, ami az antigének nagy variabilitását eredményezi, mely a Gram-negatív baktériumok szerológiai csoportosításának az alapja.

Az O-specifikus láncok megléte vagy hiánya határozza meg az LPS fenotípusát:

- az *R*-típus esetén, ahol az O-specifikus lánc hiányzik, a baktériumok *durva* felületű kolóniákat képeznek. Az *R*-típusú LPS-sel rendelkező baktérium törzsek nem-patogén mutáns törzsek;
- az *S*-típus esetében, ahol az O-specifikus lánc jelen van, a baktériumok *simá* felületű kolóniákat képeznek. Az *S*-típusú LPS-sel rendelkező baktérium törzsek vad-típusú patogén törzsek.

Az endotoxinok kimutatása egyaránt fontos az egészségügyben és a gyógyszeriparban is. Számos különböző érzékenységgű módszer ismert, azonban a LAL-teszt 2011 nyarán történt visszavonása óta nem létezik szabványos, világszerte általánosan használható vizsgálati módszer az endotoxin kimutatására.

A lipopoliszacharidok strukturális analizésére (legyen szó akár hidrolizált, akár intakt LPS-ről), számos módszert lehet említeni, például gél-elektroforézis, TLC, GC, CE, NMR vagy MALDI. Azonban ezen technikák közül egyik sem korlátozásmentes, ezért a legpontosabb eredmény elérése érdekében ezek kombinációját kell alkalmazni.

Értekezésemben az endotoxinok karakterizálására kifejlesztett gyors és hatékony kapilláris elektroforézis módszerrel, illetve az ezzel párhuzamosan alkalmazott GC-MS és MALDI-TOF módszerekkel végzett kísérletek és azok eredményeinek leírása található.

## Célok

Ezen munka fő célja az volt, hogy leírja az endotoxinok mag részének szerkezeti elemeit és szerkezetét a *S. sonnei* R-típusú izogén mutáns törzsekben. A vizsgált törzsek ugyanabból az S-típusú szülői törzsből (*S. sonnei* I. fázis) keletkeztek mutációval, így a szerkezetükben hasonlóságokat feltételezhetünk.

A cél elérése érdekében, a tanulmány céljai részletesen a következők voltak:

1. Egy megfelelő CE-LIF módszer fejlesztése a különböző szénhidrát összetevők kimutatására APTS fluoreszcens festék alkalmazásával, annak érdekében, hogy a kifejlesztett módszert alkalmazni lehessen a bakteriális endotoxinok vizsgálata során
2. A *S. sonnei* R-típusú izogén mutáns törzsekből származó bakteriális endotoxinok hidrolizált mag részének szénhidrát összetevőinek azonosítása a kidolgozott CE-LIF módszer segítségével
3. GC-MS mérések segítségével azonosítani a *S. sonnei* R-típusú izogén mutáns törzsekből származó bakteriális endotoxinok hidrolizált mag részének szénhidrát összetevőit
4. MALDI-TOF mérések segítségével meghatározni a *S. sonnei* R-típusú izogén mutáns törzsekből származó bakteriális endotoxinok mag részének szerkezeti hasonlóságait és különbségeit
5. Leírni a *Shigella sonnei* R-típusú mutáns törzsekből izolált bakteriális endotoxinok mag részének különböző szerkezetét a különböző analitikai eszközökkel nyert információk alapján, komplexitásuk növekvő sorrendjében.

## Anyagok és módszerek

### Bakteriális endotoxinok

A *Shigella sonnei* "R" mutáns törzseket (4350, 562H, R41, 4303) az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetben izolálták a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán. A baktériumokat laboratóriumi fermentorban tenyésztették, 37 °C-on.

A fenol-vizes kivonás után liofilizált endotoxinokat 1%-os ecetsavval hidrolizáltuk, hogy elválasszuk a szénhidrát részt a lipid A résztől. A keletkező oligoszacharidokat oszlopkromatográfiával tisztítottuk és a szénhidrát-tartalmú frakciókat 0.5 M kénsavval tovább hidrolizáltuk, hogy a mag rész monoszacharid összetevőihöz hozzájussunk.

A hidrolizált endotoxin-mintákat szűrtük és liofilizáltuk.

### GC-MS vizsgálatok

Az endotoxin-hidrolizátumokat redukálás és peracetilálás után, alditol-acetát származék formájában GC-MS módszerrel vizsgáltuk. A cukor-származékokat tartalmazó mintákat beszárítottuk, majd reszuszpendáltuk kloroformban.

A méréseket egy Agilent 6890N gázkromatográf készüléken végeztük, amely egy Agilent 5975 tömegspektrométer detektorral volt összekapcsolva. Az elválasztás egy Agilent DB-225 kapilláris oszlopon történt. A hidrolizált endotoxin-mintákból származó monoszacharidokat az MS-könyvtár segítségével és ismert standardok hozzáadásával azonosítottuk (ez az úgynevezett spike-olás). Belső standardként inozitolt használtunk annak alditol-acetát formájában, hiszen természetes állapotban egyik minta sem tartalmazza.

### CE-LIF

Törzsoldatként 0.1 M mono- és oligoszacharid standardokat és 2 mg/ml endotoxin-hidrolizátum vizes oldatokat készítettünk. A mintákat 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsav (APTS) fluoreszcens festék segítségével derivatizáltuk redukzív amináció útján.

A fluoreszcens festékekkel jelölt minták kapilláris elektroforetikus kísérleteit egy Zetalif lézer-indukált fluoreszcencia (LIF) detektorral felszerelt Crystal 300 CE készülékkel végeztük. A kísérleti körülmények a következők voltak: 30 kV feszültség, kb. 21  $\mu$ A áramerősség, 120 mM borát pH 10.2 háttérelktrolit. A minták fluoreszcens származékainak

azonosítását ismert standardok származékainak hozzáadásával (ez az úgynevezett spike-olás), és a GC-MS eredmények alapján végeztük.

### MALDI-TOF-MS

A *Shigella sonnei* 4350, 562H, R41 és 4303 törzsekből kivont intakt LPS mintákból 1 mg-ot feloldottuk 0.5 ml 0.1 M citromsav vizes oldatában. A mintákat Dowex 50WX8-200 (H<sup>+</sup>) kationcserélő gyanta segítségével sótalánítottuk. Ezután a mintát elhelyeztük egy rozsdamentes acél mintatartó lemezen és elkevertük 2,5-dihidroxi-benzoosav (DHB) mátrixszal, majd száradás után azonnal vizsgálni kezdtük.

A mátrixszal segített lézer deszorpció/ionizációs repülési idő tömegspektrometriás (MALDI-TOF MS) méréseket egy 1.2 m repülési csővel felszerelt Autoflex II MALDI-TOF/TOF MS készüléken végeztük. A spektrumokat negatív-ion és lineáris módban rögzítettük a 800-4000 m/z tartományban. Az MS spektrumok kiértékelésekor az alábbi átlagos tömegeket vettük alapul az ionok molekulatömegeinek számításához: GlcN ( $\beta$ -1-6-kapcsolt GlcN) diszacharid: 340.33; C14(3-OH) (3-hidroxi-tetradekánsav): 226.36; C14 (tetradekánsav): 210.36; C14unsat (telítetlen tetradekánsav): 208.34; C12 (dodekánsav): 182.31; Kdo (3-deoxi-D-manno-2-oktulonsav): 220.18; Hep (heptóz): 192.17; Hex (hexóz): 162.14; P (foszfát): 79.98; H: 1.01.

### **Eredmények és megvitatás**

#### CE-LIF módszer fejlesztése szénhidrát összetevők vizsgálatához

Annak érdekében, hogy a szénhidrátok kimutatására egy érzékeny módszert fejlesszünk, a mono-és oligoszacharidok jelölődési hatékonyságának módszertani problémáit vizsgáltuk. A cukrok konjugálódását külön-külön és keverékben történő APTS jelöléssel modelleztük. Az elválasztás és a jelölődés hatékonyságát a konjugátumok keverékeinek CZE vizsgálatával ellenőriztük. Bebizonyosodott, hogy a keverékben lévő cukroknak mind a kvalitatív, mind a kvantitatív meghatározása gondos optimalizálást igényel.

Az elválasztás hatékonyságának ellenőrzéséhez 15 mono-és oligoszacharidot jelöltünk külön-külön APTS-el (1:1 festék:szénhidrát moláris arányban). Jelölés után a konjugátumokat összekevertük (a különböző szénhidráttartalmú oldatok kiindulási koncentrációjának 1:1 moláris arányában), és kapilláris elektroforézissel vizsgáltuk. A jelölt monoszacharidok külön-külön vándoroltak, és jelentek meg az elektroferogramokon eltérő csúcsterületekkel,

kivéve a glükóz, ribóz és szacharóz APTS-konjugátumait, melyek együtt vándoroltak. Azt is megfigyelhettük, hogy a fruktóz, szacharóz, sztachióz és az aminocukrok (galaktózamin és glükózamin) konjugátumai mindig viszonylag kis csúcsokként jelentek meg az elektroferogramokon. Feltételezzük, hogy az aminocukrok gyengébb jelölődése az aminocsoportok eltérő bázicitásának tudható be. Hogy elkerüljük ezt a jelenséget, az aminocukrok acetilálása vagy más, aminocsoporthoz kapcsolódó jelölő használata javasolható. A sztachióz gyengébb jelölődése feltehetőleg a szénhidrát-molekula nagyobb méretének tudható be. Emellett, a fruktóz gyengébb jelölődésének oka valószínűleg a szerkezeti különbség a többi hexóz monoszacharidhoz képest.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a jelölés hatékonyságát és az esetlegesen fellépő versengést, a cukor molekulákat külön-külön és keverékben is jelöltük különböző cukrok:festék moláris arányban. Külön-külön jelölt cukrok esetében, az 1:7-től 4:1-ig (APTS: szénhidrát) változó molarány nem okozott változást a komponensek jelölődésében. Amikor azonban monoszacharidokat keverékben jelöltünk APTS-sel, a relatív csúcsterületek a különböző molekulák egyenetlen jelölődésére utaltak. Ha az alkalmazott APTS mennyiségének aránya az "összes szénhidrát"-hoz viszonyított 1:7 vagy 1:1 volt, bizonyos cukrok kisebb hatékonysággal vagy egyáltalán nem jelölődtek. Például az aminocukrok csak akkor jelentek meg az elektroferogramon, ha az arány legalább 1:1 volt, de egyforma csúcs alatti területek arányát csak akkor lehetett megfigyelni, ha az APTS: összes szénhidrát arány legalább 2:1 volt (vagy magasabb). Szénhidrát-keverékek jelölése esetén a komponensek kompetitív jelölődése a valóstól eltérő arányokat eredményezhet. Ez a kompetitív hatás festéktöbblet alkalmazásával kiküszöbölhető.

#### Az R-típusú endotoxinok szénhidrát összetevői és szerkezete

Az endotoxinok mag részének szénhidrát összetevőinek azonosításához a *S. sonnei* izogén rough mutánsokból izolált intakt LPS-ekről gyenge savas hidrolízissel a lipid A-t eltávolítottuk, és a különböző LPS-ekből származó csonka mag részeket tovább hidrolizáltuk, hogy kinyerjük a monoszacharid komponenseket. Ezután a monoszacharid komponensek származékait GC-MS és a CE-LIF módszerekkel vizsgáltuk. Az izogén *Shigella sonnei* R-mutánsokból kivont intakt LPS-eket MALDI-TOF-MS-sel vizsgáltuk. Az MS spektrumok összetett mintázata mind a lipid A részek, mind a mag OS részek heterogenitását jelzi. A minden spektrumban megfigyelhető kvázimolekuláris ionok  $[M-H]^-$  1134, 1361, 1569 és

1797  $m/z$  értékekkel, biszfoszforilált tri-, tetra-, penta- és hexa-acilált lipid A részeknek felelnek meg.

A *S. sonnei* 4350 esetében egyik alkalmazott elválasztási módszerrel sem detektáltunk monoszacharid komponenseket a hidrolizált frakciókban. A MALDI-TOF kísérletekben, az eltérő mértékben acilált lipid A részeknek megfelelő ionokon kívül, 1574.3, 1800.2, 2008.9 and 2237.5  $m/z$  értékéknél detektáltunk ionokat, melyek megfelelnek adott lipid A résznek két Kdo molekulával. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a *S. sonnei* 4350 – korábbi közlemények alapján egy heptóz-transzferáz-hiányos mutáns – egy abszolút rough mutáns, mely csak két Kdo molekulával bír a mag régiójában.

A *S. sonnei* 562H LPS-eiből származó hidrolizált mag GC-MS és CE-LIF analízise csak egyféle monoszacharid komponens jelenlétét mutatta ki. Bár nem rendelkezünk heptóz standarddal a spike-oláshoz, a GC-MS vizsgálatok tömegspektrometriás eredményeire alapozva heptóz-származékként azonosítottuk a kapott csúcsot, feltehetőleg D-glicero-D-mannoheptóz, melynek relatív retenciós ideje 1.44 volt a GC-MS kísérletekben. Az intakt LPS-ek MALDI-TOF vizsgálatánál két Kdo molekulát tartalmazó tri-, tetra-, penta- és hexa-acilált lipid A részeknek megfelelő értékeket figyeltünk meg: 1556.6, 1575.0, 1783.0, 1801.1, 2010.4 és 2237.4  $m/z$ . A csúcsokat 1766.9, 1993.1, 2219.8 és 2429.4  $m/z$  értékeknél az LPS kvázimolekuláris ionjaiként azonosítottuk, melyekben tri-, tetra-, penta- és hexa-acilált lipid A, két Kdo és egy heptóz komponens található. A *S. sonnei* 562H LPS-ek mag részében két Kdo komponens és egy DD-heptóz komponens található, mely eredmény korábbi tanulmányokat is alátámaszt, melyekben az ADP-L-glicero-D-mannoheptóz 6-epimeráz enzim hiányát tárták fel.

A *S. sonnei* R41 LPS-ekből származó hidrolizált mag minták GC-MS és CE-LIF analízise csak heptóz monoszacharid komponens jelenlétét mutatta ki. Bár nem rendelkezünk heptóz standarddal a spike-oláshoz, a GC-MS vizsgálatok tömegspektrometriás eredményeire alapozva heptóz-származékként azonosítottuk a kapott csúcsot, feltehetőleg L-glicero-D-mannoheptóz, melynek relatív retenciós ideje 1.59 volt a GC-MS kísérletekben. Ez az eredmény azt jelzi, hogy a *S. sonnei* 562H és az R41 mag részében található heptóz valamilyen módon különbözik egymástól, L-glicero-D-mannoheptózt feltételezve az *S. sonnei* R41 törzs endotoxinjának mag részében. Az intakt LPS-eket a *S. sonnei* R41 törzs esetében is vizsgáltuk MALDI-TOF módszerrel. Ezekben a kísérletekben, a tri-, tetra-, penta- és hexa-

acilált lipid A részeknek megfelelő csúcsokon kívül, egy másik csúcs-sorozatot is detektáltunk, ahol a 1959.7, 2185.3, 2412.1 és 2622.4  $m/z$  értékek az eltérő mértékben acilált lipid A részekhez kapcsolódó mag OS részeket tartalmazó intakt LPS-eknek feleltek meg. A 824 Da-os különbségek két Kdo és két heptóz egységet tartalmazó magszerkezetre utalnak.

Az *S. sonnei* 4303 mutánsból származó R-típusú endotoxinok monoszacharid komponenseit szintén vizsgáltuk GC-MS és CE-LIF módszerekkel, és három monoszacharidot detektáltunk. A GC-MS kísérletekben 3 csúcsot figyeltünk meg, melyek galaktóz, glükóz és heptóz összetevőknek bizonyultak, ahol a galaktóz és glükóz moláris aránya 2.0:3.1 volt, illetve a galaktóz, glükóz és heptóz alditol acetát származékainak relatív retenciós ideje 0.91, 0.95 és 1.6 volt. A kapott eredmények alapján ez a mutáns ugyanolyan típusú heptózt tartalmaz, mint a *S. sonnei* R41 mutáns törzs, vagyis L-glicero-D-mannoheptózt. A CE-LIF kísérletek során a 4303-ból származó LPS minta heptóz és glükóz komponensének fluoreszcens származékai együtt vándoroltak, de elválaszthatók voltak a galaktóz fluoreszcens származékától. A hexózok azonosítása ismert standardok származékainak hozzáadásával történt (spike-olás), míg a heptóz-standard hiánya miatt a heptózt a GC-MS eredmények segítségével azonosítottuk.

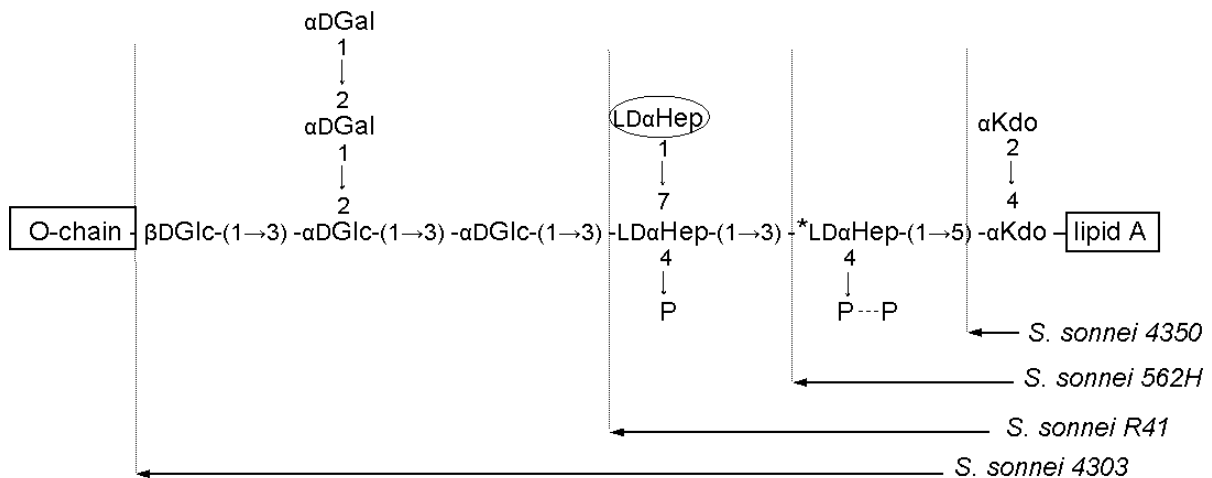
A *S. sonnei* 4303-ból származó intakt LPS-ek MALDI-TOF-MS spektrumában három régiót azonosítottunk, az 3000 – 4000  $m/z$  tartományban (i) az intakt R-típusú LPS szerkezeteknek és (ii) a lipid A részeknek (Y-típusú fragmens ionok) és az 1000 – 2100  $m/z$  tartományban (iii) az OS összetevőknek (B-típusú fragmens ionok) megfelelő csúcsokat detektáltuk. A többi izogénikus mutáns törzsnél is megfigyelhető 1134.5, 1360.9, 1568.7 és 1798.0  $m/z$  értékek biszfoszfórilált tri-, tetra-, penta- és hexa-acilált lipid A részeknek felelnek meg. Az 1988 Da-os tömegkülönbségek két Kdo-t, három heptózt, öt hexózt és két foszfát-csoportot tartalmazó magszerkezetre utalnak. Az 1000 – 2100  $m/z$  tartományban a magrés OS egységeinek megfelelő ionok (B-típusú ionok) is megfigyelhetők voltak.

Mivel a heptóz komponensek vizsgálata során eltérő eredményeket kaptunk és a CE-LIF eredmények sem voltak egyértelműek, a különböző mintákat összekevertük, hogy ellenőrizzük, valóban kétféle heptóz komponenssel van-e dolgunk. Az eredmények megnyugtatóan egyértelműek voltak, hiszen mind a GC-MS, mind a CE-LIF kísérletekben a *S. sonnei* 562H és 4303-ból származó endotoxin-hidrolizátumok keverékének vizsgálata során öt (a belső standarddal együtt), illetve három csúcsot kaptunk. Mivel már ismert volt, hogy a CE-LIF kísérletekben a *S. sonnei* 4303-ból származó heptóz származéka együtt vándorol a



glükóz származékával, egyértelművé vált, hogy a heptózek különböznek egymástól. A CE-LIF kísérletekben a csúcsok azonosítása a korábbiakkal megegyező módon történt; a hexózek azonosításához APTS-konjugált standardokat használtunk, míg a heptózek esetében a GC-MS eredményeket vettük alapul. A GC-MS és CE-LIF kísérletekben a két vizsgált szacharid származéka egyértelműen elválasztható volt egymástól, kétséget sem hagyva, hogy a *S. sonnei* mutáns törzsek endotoxinjai különböző heptózeket tartalmaznak.

A négy mutáns törzs LPS-einek javasolt kémiai összetételének és szerkezeti jellemzőinek (*S. sonnei* 4350, 562H, R41 és 4303), összefoglalása az **1. ábrán** látható.



**1. ábra** A *Shigella sonnei* izogenikus mutánsokból származó R-típusú endotoxinok kémiai szerkezete, a jelen és korábbi vizsgálatok alapján. A *S. sonnei* 562H mutáns LPS-e D-glicero-D-mannoheptózt (\*), míg a *S. sonnei* R41 és a 4303 LPS-e két vagy három L-glicero-D-mannoheptózt tartalmaz (a bekarikázott LD-heptóz csak a *S. sonnei* 4303 endotoxinjában található meg). Az “O-chain” az S-típusú *S. sonnei* I fázis endotoxinjának szerkezetére utal. Kdo: 3-deoxi-D-manno-2-oktulonsav, Hep: heptóz, Glc: D-glükóz, Gal: D-galaktóz.

### Következtetések

A szénhidrátok 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsavval való jelölésének kísérleti körülményeit vizsgáltuk, valamint az endotoxinokban jelen levő mono- és oligoszacharidok jelölődési hatékonyságát monitoroztuk kapilláris elektroforézis segítségével, LIF detektálás alkalmazásával.

A *Shigella sonnei* mutáns törzsekből származó rough típusú endotoxinok szerkezeti eltéréseit CE-LIF, GC-MS és MALDI-TOF-MS módszerek segítségével vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a

*S. sonnei* izogenikus rough mutánsok (4350, 562H, R41 és 4303) LPS részeinek szerkezete lépcsőzetes felépülést mutat. Ez az értekezés egy átfogó összehasonlítást ad a *S. sonnei* mutánsokból kivont rough endotoxinok szerkezeti variabilitásáról. Kijelenthetjük, hogy az oligo- és poliszacharidok komponenseinek azonosításához és mennyiségi meghatározásához a kísérletek gondos előkészítése szükséges.

Az értekezés tézisei:

1. kifejlesztettünk egy hatékony CE-LIF módszert ismeretlen összetételű APTS-jelölt szénhidrát keverékek vizsgálatára. Tanulmányoztuk a módszertani nehézségeket és optimalizáltuk a szénhidrát keverékek jelölődési hatékonyságát
2. hidrolízálás és APTS-derivatizálás után, a kifejlesztett CE-LIF módszerrel elválasztottuk és azonosítottuk az izogenikus rough mutáns *S. sonnei* 4350, 562H, R41 és 4303 bakteriális törzsek LPS-eiből kinyert mag részek szénhidrát komponenseit
3. hidrolízálás és alditol acetát derivatizálás után, GC-MS segítségével elválasztottuk, azonosítottuk és mennyiségileg meghatároztuk az izogenikus rough mutáns *S. sonnei* 4350, 562H, R41 és 4303 bakteriális törzsek LPS-eiből kinyert mag részek szénhidrát komponenseit
4. a fent említett bakteriális törzsekből kivont LPS-ek mag részének és lipid A részének szerkezetét MALDI-TOF MS segítségével határoztuk meg. Az intakt LPS-ek molekulatömegeit meghatároztuk
5. a MALDI-TOF, GC-MS és CE-LIF vizsgálatok segítségével kapott adatok alapján átfogó képet adtunk a *S. sonnei* 4350, 562H, R41 and 4303 bakteriális törzsek intakt LPS-einek összetételéről és szerkezetéről.

Egy adott kórokozó baktériumtörzs endotoxin-összetételének pontos ismerete nagyon fontos, mivel a szerológiai keresztreakciók félrevezetőek lehetnek. Az új kapilláris elektroforetikus módszerünk gyors és nagyon érzékeny módszer a bakteriális LPS-ekből kinyert szénhidrát keverékek kimutatására. Habár ez a munka csak R-típusú bakteriális törzsekkel foglalkozik, a jövőben lehetséges ennek a módszernek az alkalmazása (tömegspektrometriás módszerekkel együtt) nem csak R-, hanem S-típusú endotoxinok vizsgálatára is, lehetővé téve a patogén

bakteriális törzsek endotoxinjaiban az O-specifikus poliszacharid lánc szerkezetének és összetételének meghatározását.

### Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

**Bui, A.**, Kocsis, B., and Kilar, F. (2008), Methodology to label mixed carbohydrate components by APTS, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **70 (6)**, 1313-1316.

IF: 1.994

**Bui, A.**, Kilar, A., Dornyei, A., Poór, V., Kovács, K., Kocsis, B., Kilar, F. (2011), Carbohydrate composition of endotoxins from R-type isogenic mutants of *Shigella sonnei* studied by capillary electrophoresis and GC-MS, *Croatica Chemica Acta*, **84 (3)**, 393-398.

IF: 0.713 (2010)

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

IF: 3.289 (2010)

### Az értekezéshez kapcsolódó előadások

Kilar, F., **Bui, A.**, Kilar, A., Kocsis, B., Szabó, Z., Farkas, V.: Study of structure-function relationship in endotoxin analysis by microchips and mass spectrometry  
*22<sup>nd</sup> International Symposium on Microscale Bioseparations, MSB2008*  
March 9-13 Berlin, Germany 2008

Kilar, F. **Bui, A.**, Kilar, A., Kocsis, B., Szabó, Z., Farkas, V.: Analysis of endotoxins by mass spectrometry and microchips  
*8<sup>th</sup> Csaba Horváth Medal Award Symposium*  
April 14-15 Innsbruck, Austria 2008

Kilar, F., **Bui, A.**, Farkas, V., Kilar, A., Kocsis, B., Szabó, Z.: The „world” of endotoxins in separation science  
*Analysdagarna*  
June 16-18 Göteborg, Sweden 2008

Kilar, A., **Bui, A.**, Szabó, Z., Dornyei, A., Kocsis, B., Kilar, F.: Analysis of endotoxin structures by MALDI-MS  
*XIV. Nemzetközi Vegyészkonferencia*  
November 13-15 Kolozsvár, Romania 2008

## Az értekezéshez kapcsolódó poszterek

**Bui, A.**, Péterfi, Z., Kustos, I., Kocsis, B., Kilár, F.: Optimization of experimental conditions in the analysis of APTS-labelled hydrolyzed endotoxins by capillary electrophoresis

*14<sup>th</sup> International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques, ITP 2004*

September 12-15 Rome, Italy 2004

**Bui, A.**, Bufa, A., Poór, V., Kocsis, B., Kilár, F.: Examination of sugar content of bacterial endotoxins by GC-MS

*7<sup>th</sup> International Symposium and Summer School on Bioanalysis*

June 10-15 Pécs, Hungary 2007

**Bui, A.**, Bufa, A., Poór, V., Kocsis, B., Kilár, F.: Examination of sugar content of bacterial endotoxins by GC-MS

*7<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods*

September 5-7 Siófok, Hungary 2007

**Bui, A.**, Kocsis, B., Kilár, F.: Profiling of bacterial endotoxins by capillary electrophoresis

*22<sup>nd</sup> International Symposium on Microscale Bioseparations, MSB2008*

March 9-13 Berlin, Germany 2008

Dörnyei, Á., Kilár, A., **Bui, A.**, Szabó, Z., Kocsis, B., Kilár, F.: Mass spectrometric analyses of lipopolysaccharides extracted from *Shigella sonnei* rough-type mutant strains

*6<sup>th</sup> International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, CECE 2009*

November 5-8 Pécs, Hungary 2009

Dörnyei, Á., Kilár, A., **Bui, A.**, Szabó, Z., Kocsis, B., Kilár, F.: Mass spectrometric analyses of bacterial lipopolysaccharides

*25<sup>th</sup> International Symposium on Microscale BioSeparations, MSB 2010*

March 21-25 Prague, Czech Republic 2010

## Egyéb poszterek

Konecsni, T., Pogány, Á., **Bui, A.**, Dergez, T., Kilár, F.: Hormon mRNS-ek térbeli elrendeződése egy emberi hipofízisben

Home Scientific Student Conference

March 9-10 Pécs, Hungary 2000

Dergez, T., Konecsni, T., Pogány, Á., **Bui, A.**, Szókisboris, P., Szécsényi, M., Funa, K., Muhr, C., Kilár, F.: Spatial distribution of hormon mRNAs in a pituitary gland

*6<sup>th</sup> Symposium on Instrumental Analysis*

June 24-27 Graz, Austria 2001

**Bui, A.**, Réglér, M., Tron, T., Kilár, F.: Production of different laccase isoforms for electrophoretic separation

*8<sup>th</sup> Symposium on Instrumental Analysis*

September 25-28 Graz, Austria 2005

- Bui, A.,** Réglie, M., Tron, T., Kilar, F.: Production of different laccase isoforms for electrophoretic separation  
*Club Métalloprotéines et Modèles*  
October 2-5 Carry-le-Rouet, France 2005
- Bui, A.,** Tron, T., Kilar, F.: Study of Trametes C30 laccase isoforms  
*XIVème Colloque De L'Ecole Doctorale SVS*  
June 8-9 Marseille, France 2006
- Bui, A.,** Tron, T., Kilar, F.: Separation of laccase isoforms from Trametes C30 by capillary electrophoresis  
*7<sup>th</sup> International Symposium and Summer School on Bioanalysis*  
June 10-15 Pécs, Hungary 2007
- Bui, A.,** Tron, T., Kilar, F.: Separation of laccase isoforms from Trametes C30 by capillary electrophoresis  
*7<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods*  
September 5-7 Siófok, Hungary 2007