

**ENDOTOXINOK MONITOROZÁSA
ÚJ KAPILLÁRIS- ÉS MICROCHIP
ELEKTROFORETIKUS MÓDSZEREKKEL
ÉS TÖMEGSPEKTROMETRIÁVAL**

Kilár Anikó

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Kocsis Béla

Programvezető: Prof. Dr. Emőd Levente, emeritus professzor

Doktori Iskola vezető: Prof. Dr. Lénárd László, akadémikus

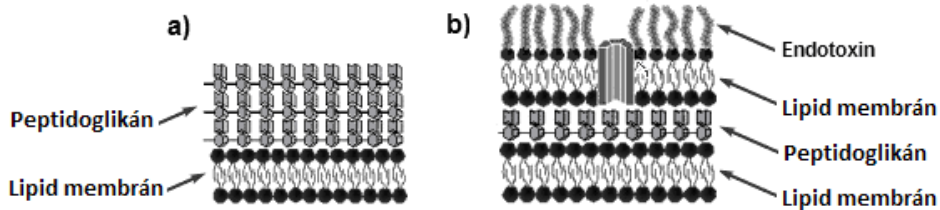


**ORVOSI MIKROBIOLÓGIAI ÉS IMMUNITÁSTANI INTÉZET
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**

2009

1. Bevezetés

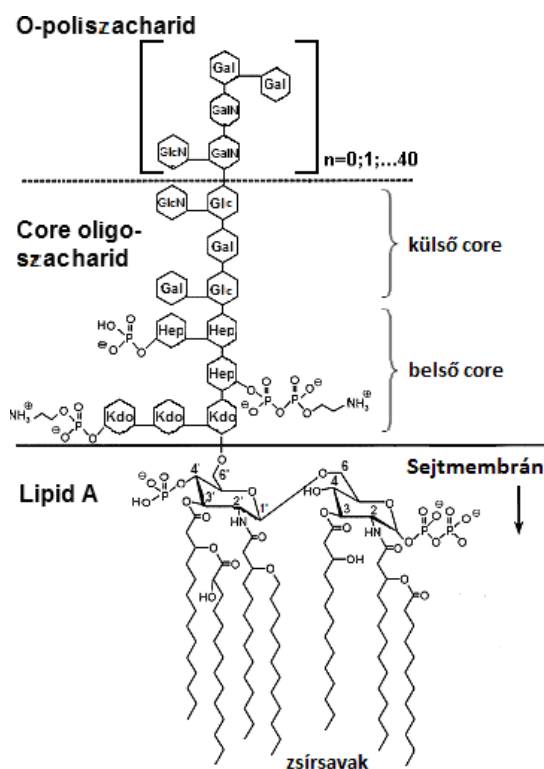
A baktériumok többsége sejtfalszerkezeti tulajdonságaik alapján besorolhatók a Gram-pozitív, vagy a Gram-negatív csoportokba. Az endotoxinok a Gram-negatív baktériumok külső membránjának állandó alkotóelemei (1. ábra), egyúttal fontos virulencia faktorok. A Gram-negatív mikroorganizmusok megtalálhatók a normál bélflórában, valamint a természetes környezetben, beleértve az emberi patogéneket is (pl. *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus*). Az endotoxinok neve a görög *endo* (belső) szóból származik.



1. ábra A Gram-pozitív (a) és a Gram-negatív (b) baktériumok sejtfalszerkezetének vázlatos képei

1.1. Az endotoxinok kémiai felépítése

Kémiailag az endotoxinok lipopoliszacharid (LPS) jellegű makromolekulák keverékei. A *smooth* (S) típusú intakt LPS szerkezete három részre tagolódik: egy hidrofób lipid részre (elnevezése *lipid A*), a hozzá kovalensen kapcsolódó hidrofil *core oligoszacharid* egységre és egy *O-poliszacharid láncra* (2. ábra). Az LPS a lipid A részen keresztül kapcsolódik a baktérium sejtfalához, míg az O-oldalláncok kifelé mutatnak. A mutálódott baktériumok *rough* (R) típusú endotoxinokat állítanak elő, amelyekből hiányzik az O-oldallánc. Elnevezésük ezért gyakran lipooligoszacharid (LOS). Az endotoxinok valamennyi szerkezeti egységében heterogenitás (fajon belüli heterogenitás) található. Így egy S típusú endotoxin különböző hosszúságú O-poliszacharid láncokat tartalmazó, illetve O-oldallánc nélküli és nem teljes core régiót tartalmazó komponensekből álló keverék. Az LPS-ek (főképp az O-oldalláncok) szerkezete a baktériumfajok között is nagy változatosságot mutat (fajok közti heterogenitás), emiatt az endotoxinok alkalmasak szerotípus meghatározásra.



Az LPS-eket egyszerű extrakciós, mosási és tisztítási eljárásokkal lehet kipreparálni a baktériumokból. Az LPS molekulák amfifil jellegük miatt vizes oldatokban aggregálódnak. Az aggregátumok molekula-tömege akár 1 millió Da is lehet, míg az endotoxin monomer molekulatömege 2-20 kDa között mozog. Az aggregátumokat különböző felületaktív anyagok és fehérjék bontják.

2. ábra Egy intakt LPS molekula szerkezete.

Gal: galaktóz, Glc: glükóz, Hep: heptóz, GalN: N-acetil-D-galaktózamin, GlcN: N-acetil-D-glükózamin, Kdo: 2-keto-3-deoksi-oktulonsav. A zsírsavláncok általában telítettek, szénatom-számuk 12 és 18 között mozog. A negatív töltéseket a foszfát, a Kdo és (olykor) hexuronsav maradékok szolgáltatják. Gyenge savas hidrolízis hatására a Kdo – core, valamint a Kdo – Kdo közti kötések hasadnak, ezért ezt az eljárást alkalmazzák a lipid A és a poliszacharid elválasztására.

1.2. Az endotoxinok biológiai hatásai

A baktérium növekedése és lízise során az endotoxin leválik a baktériumról. Az O-oldalláncok elsődleges célmolekuláit képezik a makrofágok és az epitel sejtek immunreceptorainak számos állatban és emberben. A véráramba került endotoxin 1 EU (endotoxin egység = 0.1 ng endotoxin)/kg testsúlynál nagyobb koncentrációban számos potenciálisan életveszélyes szövődmény forrása lehet; a toxikusság a lipid A résznek tulajdonítható. A patofiziológiai reakciók közé tartozik a magas láz, hipotenzió, intravaszkuláris koaguláció, endotoxin sokk és akár halál. A Gram-negatív bakteriális szepszis esetében gyakran megfigyelhetők ezek a tünetek.

Az endotoxinok hőtüro képessége nagy (a standard laboratóriumi körülmények közti autoklavozás nem elégséges a molekulák degradálásához) ezért az infúziók, a dializáló oldatok és egyéb, gyakran használt parenterális készítmények előállítását és endotoxin mentességét törvényileg szigorúan szabályozzák.

Káros hatásuk mellett, az immunstimuláló hatású endotoxinok az egész nyirok-és vérképző rendszer egyik legfontosabb serkentői.

1.3. Az endotoxinok detektálásának és vizsgálatának módszerei

Az endotoxinok komoly betegséget előidéző képességének felismerése óta sok kutatás irányul ma is az aktív részek izolálására, tisztítására és részletes kémiai elemzésére. Az endotoxinok detektálására és analízisére szolgáló jelenlegi módszerek két csoportra oszthatók. Az egyik a bioaktivitást detektálja, míg a másik a szerkezeti elemzésre használatos. Az úgynevezett "endotoxin próbák" különböző *in vitro* és *in vivo* biokémiai tesztekre épülnek, mint pl. az USP nyúl teszt vagy a LAL (*Limulus* Amebocyte Lysate) teszt.

A szerkezeti elemzés hosszú ideig problémás volt, hisz az amfifil LPS molekulák vizes oldatban aggregálódnak, ami jelentősen megnehezíti a molekulák vizsgálatát. Rendszerint az LPS-ek gyenge illetve erősen savas hidrolízis hatására keletkezett felépítő részeit (pl. core régiót vagy lipid A részt) vizsgálják gázkromatográfiával, mágneses magrezonancia spektroszkópiával (NMR) és lágy ionizációs tömegspektrometriával (MS). Ezek a módszerek többnyire kiegészítik egymást a teljes molekula szerkezetének felderítésében. A kémiai degradáció közben azonban fennáll a veszély, hogy labilis, ám biológiailag fontos funkciók csoportokat veszíthetünk el.

Az intakt endotoxinok heterogenitásának feltérképezésére leggyakrabban az ezüstözéssel kombinált SDS-poliakrilamid gél-elektroforézis módszer használatos. Ilyenkor az *S* endotoxinok „létra-mintázata” alapján meg lehet különböztetni egymástól az *S* és az *R* endotoxinokat, valamint a különböző *S* LPS-eket (a „létra-sávok” az O-oldallánc ismétlődő egységeinek számát adják meg). Sokszor előfordul azonban, hogy elkülönülő sávok helyett széles (diffúz) sávok jelennek meg a gélen, ezért az ezüstözéssel történő detektálás felbontóképessége korlátozott.

Az endotoxinok gyors, érzékeny és kvantitatív jellemzése standard optikai detektorok alkalmazásával kihívást jelent a kutatók számára, ugyanis az LPS molekulákban nem található kromofór csoport. A kapilláris elektroforézis (CE) és a mikrochip elektroforézis UV/VIS vagy fluoreszcens detektorokat használó nagyfelbontású elválasztástechnikai módszerek, melyeket széles körben alkalmaznak biológiai molekulák (gyógyszer, peptid, fehérje, nukleotid, szacharid, vírus, sejt) vizsgálatára. Felmerült a kérdés, hogy ezek a technikák használhatók-e endotoxinok analízisére is. Az endotoxin-kutatás irodalmában csupán néhány CE alkalmazás, míg egyetlen mikrochip elektroforetikus alkalmazás sem található.

A másik nagy kihívást az endotoxinok nagymértékű (mikro)heterogenitásának felderítése jelenti, azaz az intakt LPS-ek közvetlen szerkezeti azonosítása. Tézisemben bizonyos enterobakteriális LPS-ek kapilláris és mikrochip elektroforetikus, valamint tömegspektrometriás (azon belül MALDI-TOF MS) jellemzését tárgyalom.

2. Célkitűzések

A dolgozat fő célja a különböző enterobakteriális endotoxinok (lipopoli- és lipooligoszacharidok keverékének) új, gyors és pontos szerkezeti meghatározását szolgáló módszerek kifejlesztése standard optikai detektorok felhasználásával majdani immunkémiai (pl antigén szerkezetanalízis) vizsgálatokhoz. Célunk volt még az endotoxin komponensek pontos molekulatömegének és kémiai szerkezetének meghatározása. A kihívást jelentő feladatok a következő pontokban foglalhatók össze:

1. Kapilláris elektroforézissel vizsgálni az UV-inaktív endotoxinokat fehérje-komplexeik UV-detektálása segítségével, egyúttal növelni az amfifil endotoxinok oldhatóságát. (Kísérleteink alapjául szolgált, hogy a fehérjék dezaggregálják az endotoxinokat, és azokkal UV-abszorbeáló komplexet képeznek.)
2. Kifejlesztetni a változatos szerkezetű tisztított LPS molekulák gyors és nagy érzékenységgű kimutatását microchip elektroforézissel (Bioanalyzer, Agilent), egy, az eredetileg fehérjék kimutatására alkalmas módszer átdolgozásával. Megvizsgálni annak lehetőségét, hogy az új mikrochip elektroforetikus rendszerünk alkalmas-e a rutin módon alkalmazott, de idő- és munkaigényes, ezüstözéssel kombinált SDS-PAGE módszer kiváltására. (A módszer alapja az a feltételezés volt, hogy az endotoxinok vizes oldatban kölcsönhatnak az SDS-sel és az SDS pedig kölcsönhatásba lép a detektáláshoz használt fluoreszcens festékkel.)
3. Kifejlesztetni a közvetlenül tenyészetből kinyert, csak részben tisztított endotoxinok mikrochip elektroforetikus analízisét az *S* és *R* endotoxinok kemotípusának gyors meghatározására. Összevetni a tisztított és a tenyészetből kivont részben tisztított endotoxin minták elektroforetikus profilját.
4. Meghatározni bizonyos *R* és *S* típusú LPS-ek molekulatömegét és jellemezni a heterogenitásokat MALDI-TOF tömegspektrométerrel.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Baktériumtörzsek és endotoxinok

Kísérleteinkben a következő törzsekből kivont endotoxinokat vizsgáltuk: az *S* típusú *Escherichia coli* NCB O21, O55, O83, O111, O112, 102, ATCC 25922, *Proteus morganii* O34, *Salmonella urbana* O30, *Salmonella adelaide* O35, *Salmonella minnesota* wildtype, *Shigella sonnei* phase I, *Shigella dysenteriae* 2, *Yersinia enterocolitica* O9, és *R* típusú *Escherichia coli* NCB D31, *Salmonella minnesota* R595, *Shigella sonnei* phase II (4303), 41, 562H és 4350. A törzsek az Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetének saját törzsgyűjteményéből származtak.

A baktériumokat 30 literes fermentorban 37°C-on 7.2-es pH-jú táptalajban tenyésztettük. A baktériumsejteket centrifugálással gyűjtöttük össze, majd az üledéket acetonnal szárítottuk. Az *S* típusú lipopoliszacharidokat *Westphal és mtsai* forró fenol/vizes módszerével, míg az *R* típusú LPS-eket *Galanos és mtsai* fenol-kloroform-petroléter extrakciójával vontuk ki, ultracentrifugálással tisztítottuk, majd liofileztük. A liofilizált LPS mintákból 1 mg/ml LPS szuszpenziót készítettünk.

A lipid A részek előállításához az LPS-eket enyhe savas körülmények között hidrolizáltuk (0.1 M nátrium acetát puffer, pH 4.4), liofilizáltuk és sósav/etanol keverékével extraháltuk. Az üledéket, mely a lipid A-t tartalmazta, desztillált vízzel mostuk és liofilizáltuk.

A részlegesen tisztított endotoxin mintákat közvetlenül sejtlizátumokból állítottuk elő. A baktérium törzseket 1 ml bouillonban tenyésztettük, majd lizozimmal és LPS lízis pufferrel inkubáltuk (lizáltuk), s a fehérjéket proteináz K enzimmal emésztettük. A proteinmentes LPS mintákat további tisztítás nélkül azonnal analizáltuk.

3.2. Fehérjék és mintaelőkészítés kapilláris elektroforézis vizsgálatokhoz

A hemoglobint emberi vérből állítottuk elő, a transferrin por alakban állt rendelkezésre. A liofilizált endotoxin mintákat az elektrolit pufferben (5 mM Tris-HCl, pH 8.5) szuszpendáltuk 1 mg/ml-es koncentrációban. A hemoglobin végkoncentrációja a lipopoliszacharid mintákban 18 µM (1.2 mg/ml), a transferriné 1 mg/ml volt. A keverékeket 37°C-on inkubáltuk 1 vagy 2 óráig, s minden órában elvégeztük az elektroforetikus futtatást.

3.3. Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gél-elektroforézis

A liofilizált LPS mintákat „LPS mintapufferben” diszpergáltuk (1 mg/ml), majd desztillált vízzel hígítottuk. A gél-elektroforézist *Laemml* féle diszkontinuus rendszerben, 15 %-os szeparáló és 4 %-os stacking gélben végeztük, 150 V konstans feszültséggel. A mintákkal párhuzamosan Pharmacia alacsony molekulatömegű fehérje-standard sort futtattunk. Az LPS géleket *Tsai és Frasch* módszerével ezüstöztük.

3.4. Kapilláris elektroforézis

A mérések BioFocus 3000 kapilláris elektroforézis készüléken történtek. A kapilláris (28 cm x 50 µm belső átmérő, 23.5 cm effektív hossz) belső felületét poliakrilammal fedtük az elektrooszmózis és a minták adszorpciójának elkerülése végett. A háttér-elektrolit 0.05 M Tris-HCl, pH 8.5. A mintákat 1-5 psi×sec injektálással juttattuk a kapillárisba (az injektált mennyiség kb. 2 nl), a komponensek a katódtól (negatív pólus) az anód (pozitív pólus) felé vándorolnak. A feszültség 10 kV, a rendszer hőmérséklete 25°C. A detektálás UV fényben 205–340 nm-en és látható fényben 340–800 nm-en történt diódasoros detektorral, a futtatási idő 25 perc. Az elektroferogramok kvantitatív kiértékelését a Biofocus Integrator System segítségével végeztük el.

3.5. Mikrochip elektroforézis

A mikrochip elektroforetikus futtatásokat Agilent Bioanalyzer 2100 típusú készüléssel végeztük lézerindukált fluoreszcencia detektort alkalmazva. A futtatásokhoz Agilent Protein LabChip 50, 80, vagy 200 chipkészletet használtuk a hozzá való oldatrendszerrel (a számok a szeparálógél „szűrőképességét” jelentik kDa-ban). A tisztított LPS szuszpenzióhoz vagy a sejtlizátumból kivont LPS mintához különböző koncentrációjú SDS-oldatot adtunk, mintákat és az Agilent fehérje standard keveréket szonikáltuk, melegítettük, centrifugáltuk majd desztillált vízzel hígítottuk.

A chip csatornáit hidrodinamikusan töltöttük fel a szeparáló géllal (polidimetilakrilamid alapú lineáris polimer oldat), amely tartalmazta a fluoreszcens festéket. A mintabemérő helyeket és a molekulatömeg standard bemérő helyeit feltöltöttük az LPS mintákkal illetve (az adott chipkészlethez tartozó) fehérje standarddal. A minták injektálása elektroforetikus történt (az injektált mennyiség kb 40 picoliter), a komponensek az anód (pozitív pólus) felé vándoroltak; a rendszer hőmérséklete 25°C; egy minta futtatási ideje 50 s.

Az LPS–SDS-festék komplexek a kapillárison belül alakulnak ki, mivel a fluoreszcens festék erős komplexet képez az SDS-sel. A nem kötődött fluoreszcens festék a detektálási pont előtt pufferrel hígul. Az elektroferogramok kvantitatív kiértékelését a 2100 Expert software segítségével végeztük el. A molekulatömeg megbecsüléséhez az egyes chipkészletekhez tartozó fehérje standardot használtuk. A készülék az elektroferogramok mellett automatikusan generál egy analóg gél-képet is.

3.6. MALDI-TOF tömegspektrometria

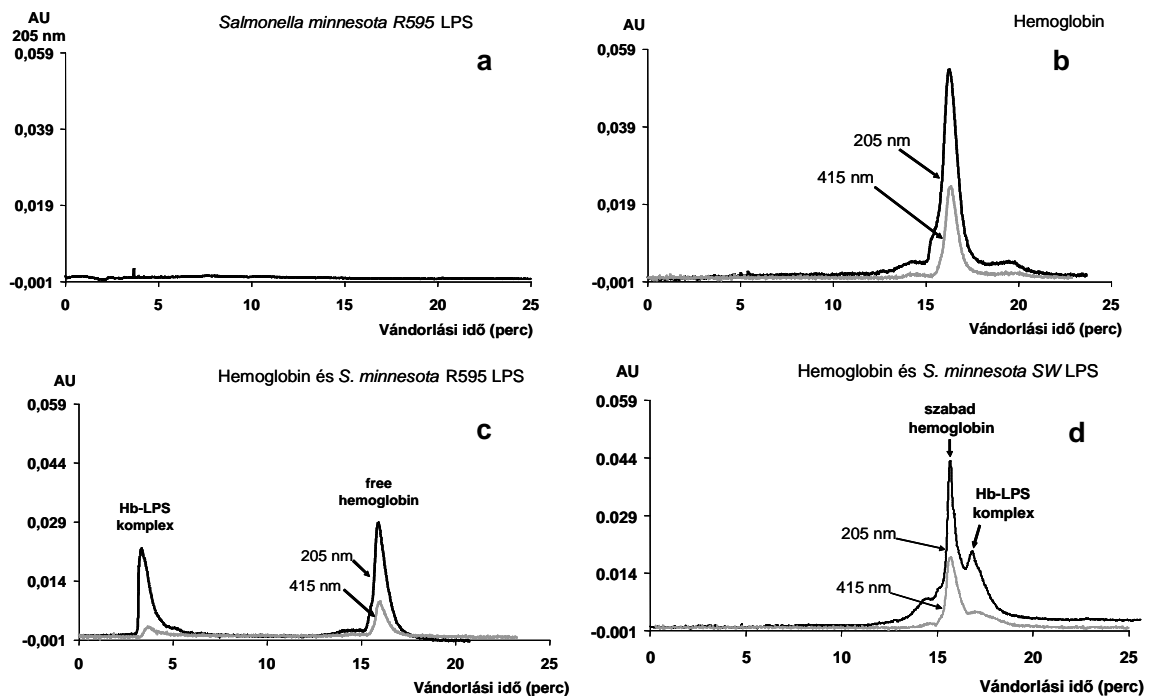
1 mg LPS-mintát 1ml 0,1 M-os citromsav oldatba szuszpendáltunk, majd a szuszpenziót ultrahangoztuk. Az oldat néhány mikroliterét Dowex kationcserélő gyantán sőtalanítottuk. A minta felviteléhez “dried-droplet” módszert alkalmaztunk, mátrixnak 2,5-dihidroxi-benzoésavat használtunk. A minták tömegspektrometriás analízisét Bruker Autoflex II. MALDI-TOF/TOF MS tömegspektrométeren végeztük lineár vagy reflektrom módban. A jeleket negatív módban detektáltuk a 1000–10000 m/z tartományban. A készülék 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 molekulák tömegeinek összegzésével végeztük. Az tömegspektrumban megjelenő $[M-H]^-$ kvázimolekuláris ionokhoz hozzárendeltük a szerkezetet.

4. Eredmények és megvitatás

4.1. Kapilláris elektroforézis módszer kifejlesztése endotoxinok detektálására

Az endotoxinok szerkezetükből adódóan nem tartalmaznak UV-elnyelő csoportot, ezért az elektroforézis során, humán hemoglobin vagy transferrin jelenlétében, Hb/LPS vagy Tf/LPS komplexek formájában detektáltuk őket 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 *S. sonnei* törzsekből izolált endotoxinok elektroforetikus profilja az *S* és *R* típusuktól függően változott. Egyes endotoxinokra jellemző volt, hogy minél tovább tart az inkubálás ideje, annál több fehérje lesz jelen fehérje/LPS komplex formában, míg a fehérje teljes mennyisége átalakul. Az endotoxinok kimutatási határértéke (*R* típusú endotoxinok esetén) 50 µg/ml.

A 3. ábrán néhány Hb és LPS kölcsönhatásából származó eredmény látható. Az LPS/Hb komplexek kimutatása orvosi szempontból is fontos lehet, hiszen pl. a Hb-tartalmú „mesterséges vérben” esetleg jelenlévő endotoxin toxikus mellékhatásokat eredményez.



3. ábra Kapilláris elektroforézis futtatások: a) LPS, b) Hb, c) Hb és egy *R* típusú LPS keveréke, és d) Hb és egy *S* típusú LPS keveréke injektálásával. Az LPS-ek (általában) nem UV-aktívak (a); a Hb 205 and 415 nm-en fényt abszorbeál (b); a Hb csúcs mellett megjelent az *R*-LPS/Hb komplex csúcsa (c); a Hb csúcs után, azzal átfedésben megjelent az *S*-LPS/Hb komplex csúcsa (d).

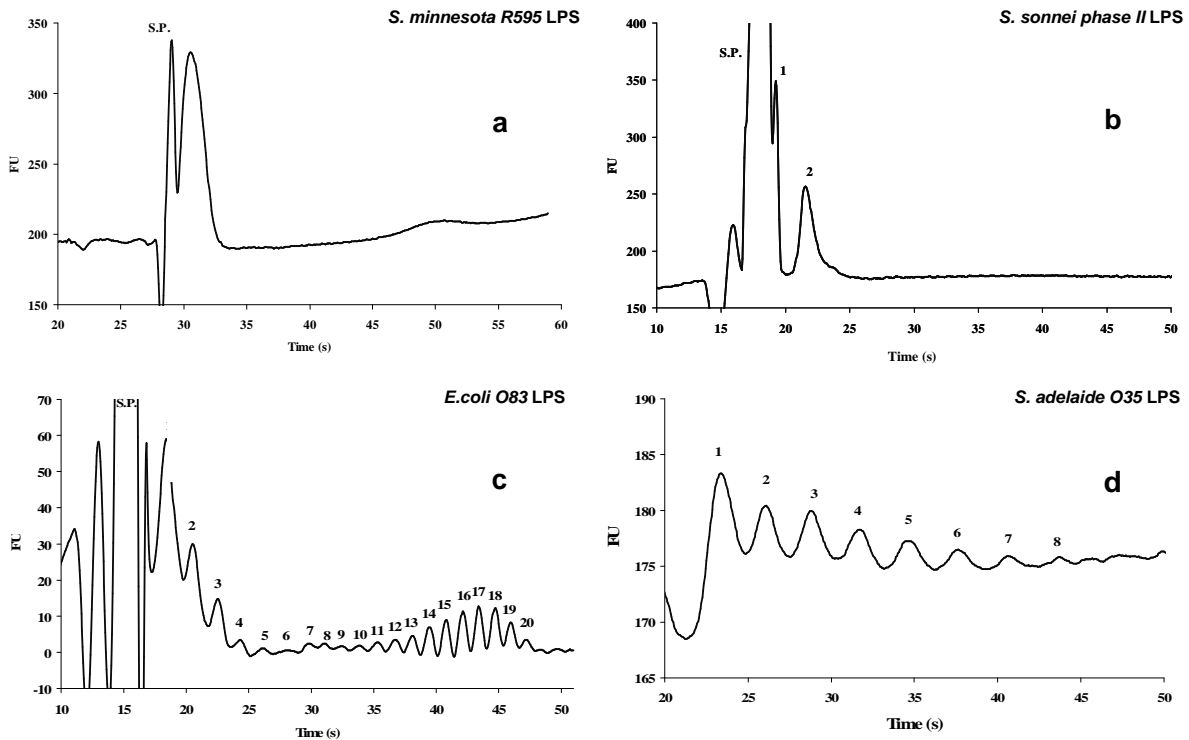
4.2. Mikrochip elektroforézis módszer kifejlesztése endotoxinok monitorozására

Az amfifil LPS molekulák elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatások révén különböző felületi anyagokkal (pl. SDS) kölcsönhatnak. Erre alapozva dolgoztuk ki az eredetileg protein vizsgálatokra tervezett mikrochip alkalmazás feltételeit bakteriális lipopolisaccharidok vizsgálatához.

Az endotoxin aggregátumokat 40-50 mM-os SDS oldat alkalmazásával lehetett eredményesen dezaggregálni. Az endotoxinokat fluoreszcens festék segítségével dodecil-

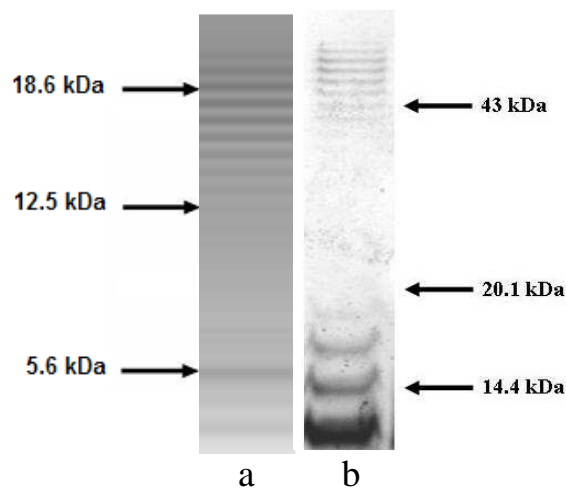
szulfát jelenlétében detektáltuk lézer-indukált fluoreszcencia detektorral (a fluoreszcens festék az LPS-SDS komplexek SDS komponenséhez kötődött).

Az *R* típusú (O-poliszacharid nélküli) LPS-ek elektroferogramjában egy vagy kettő mintacsúcs látható (4a és b ábra), míg az *S* típusú LPS elektroferogramjában több mintacsúcs jelenik meg (1-20-ig számozva a 4c ábrán, és 1-8-ig számozva a 4d ábrán) az O-poliszacharid lánc ismétlődő egységeinek számától függően. A legnagyobb relatív mennyiségben előforduló endotoxin-komponensek kimutatási határa 6 µg/ml.



4. ábra *R* típusú (a-b) és *S* típusú (c-d) LPS-ek mikrochip elektroferogramja Agilent Protein 80 LabChip használatával. Az *S* típusú *E.coli* O83 és a *Salmonella minnesota* O35 LPS profiljában a „csúcshullámok” eltérő eloszlást mutatnak az LPS-ek eltérő heterogenitásából adódóan. S.P.= rendszercsúcs, azaz a szabad SDS-festék komplex csúcsa.

Azonos endotoxinok hagyományos, ezüstözéssel kombinált SDS-PAGE módszerrel futtatott, és a mikrochip elektroferogram alapján generált gél-képei nagymértékben hasonlítanak egymáshoz (5. ábra). Az *E. coli* O83 LPS összes komponensének számított és „becsült” molekulatömeg értékeit az 1. táblázat tartalmazza.



5. ábra Az *E. coli* O83 LPS gél-elektroforetikus mintázata. a) A mikrochip elektroferogram alapján generált gél-kép és b) hagyományos SDS-PAGE gél-kép ezüstözéses előhívás után. A nyilak az alkalmazott módszerek fehérje molekulatömeg standardjainak elektroforetikus vándorlásának pozícióit jelölik. A két gél-kép mintázata hasonló.

1. táblázat Az *E. coli* O83 LPS komponenseinek molekulatömegei a mikrochip elektroferogramban megjelent LPS komponensek számának függvényében.

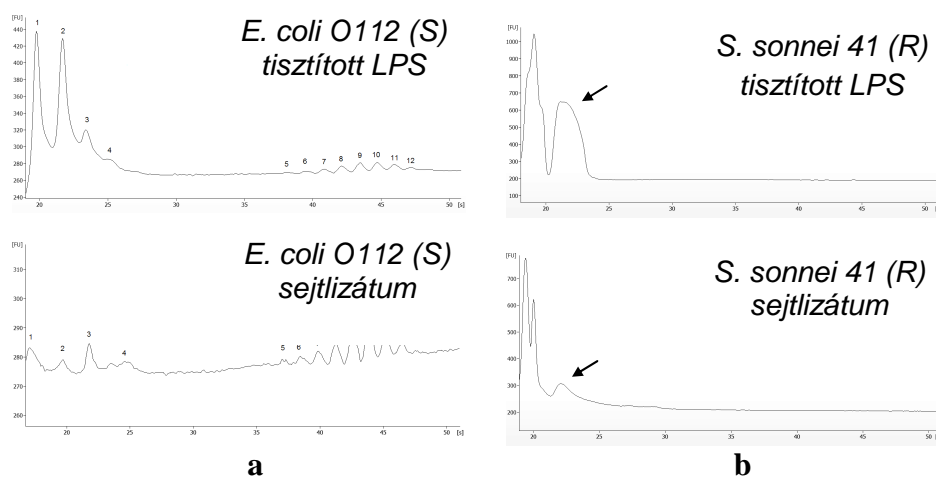
Csúcs száma	Számított molekula tömeg (kDa)	SDS-PAGE Becsült molekula tömeg (kDa)	Mikrochip Becsült molekula tömeg (kDa)	Relatív csúcsterület
1	3.9		6.1	1000
2	4.7		10.0	243
3	5.6	14.4	14.5	185
4	6.5		17.9	50
5	7.3		22.4	54
6	8.2	20.1	25.9	12
7	9.1		32.1	23
8	9.9		35.7	23
9	10.8		39.5	12
10	11.7		45.0	15
11	12.5		49.0	42
12	13.4		54.5	66
13	14.3		59.1	89
14	15.1	43	64.2	131
15	16.0		71.9	185
16	16.7		79.6	232
17	17.7		87.3	212
18	18.6		95.0	162
19	19.5		100.8	97
20	20.3		107.1	42

Az számított molekulatömegeket a molekulaszervezet alapján, míg becsült molekulatömegeket az adott módszer fehérje standardjainak vándorlási pozíciójából határoztuk meg. Fontos megjegyezni azonban, hogy a pontos molekulatömeg meghatározásához sem a mikrochip, sem az SDS-PAGE módszerhez nem áll rendelkezésre megfelelő molekulatömeg standard. Így nyilvánvaló, hogy az 1. táblázat számított és a becsült molekulatömeg értékei ellentmondó értékeket adnak (az LPS-SDS-festék komplexek nettó felületi töltése lényegesen különbözik az SDS-denaturált fehérjékétől, ebből következően a két komplex migrációs tulajdonságai is különböznek). Ugyanakkor a különböző LPS komponensek (csúcsok) integrálásával történő relatív mennyiségek meghatározása nagy előrelépést jelent az endotoxinok vizsgálatában.

Többféle mutáns baktériumból származó endotoxin szerkezetek gyors összehasonlításánál (mint pl. epidemiológiai tanulmányoknál) az endotoxinok kivonására a *Hitchcock és Brown* által kidolgozott, mindössze 1 ml baktérium-tenyészetet igénylő sejtlizátumos módszert alkalmazzák, amely egy viszonylag gyors endotoxin preparálási módszer (kb. 40 óra). Az endotoxinokat kivonás után további tisztítási lépések nélkül analizálják (ezért is nevezzük részben tisztított LPS-eknek) SDS-PAGE technikával.

Az általunk kifejlesztett mikrochip elektroforetikus módszerrel megvizsgáltunk sejtlizátumból előállított LPS mintákat is. Vakpróbaszerűen, az általunk vizsgált 18 endotoxin valamennyi sejtlizátumából azonosítani tudtuk az *S/R* kemotípusát. Az azonosítást minden minta esetében elvégeztük a tisztított LPS-párjával is. A tisztított és a sejtlizátumból származó endotoxinok elektroferogramjai nagymértékben hasonlítottak egymásra (6. ábra).

A módszer érzékenység nagy, mivel 1 ml baktériumtenyészetet használva (ez megfelel kb. 10^8 sejtnek) kevesebb, mint 1 ng LPS tartalmú mintákból karakterisztikus és reprodukálható elektroforetikus profilokat kaptunk a különböző endotoxinokra.



6. ábra A tisztított és a sejtlizátumból származó részlegesen tisztított LPS-minták mikrochip elektroforézis futtatása. A két a) *S* típusú LPS-minta, és a két b) *R* típusú LPS-minta egymáshoz hasonló módon detektálhatók. A nyílak jelölik az *R* endotoxinból származó csúcsokat.

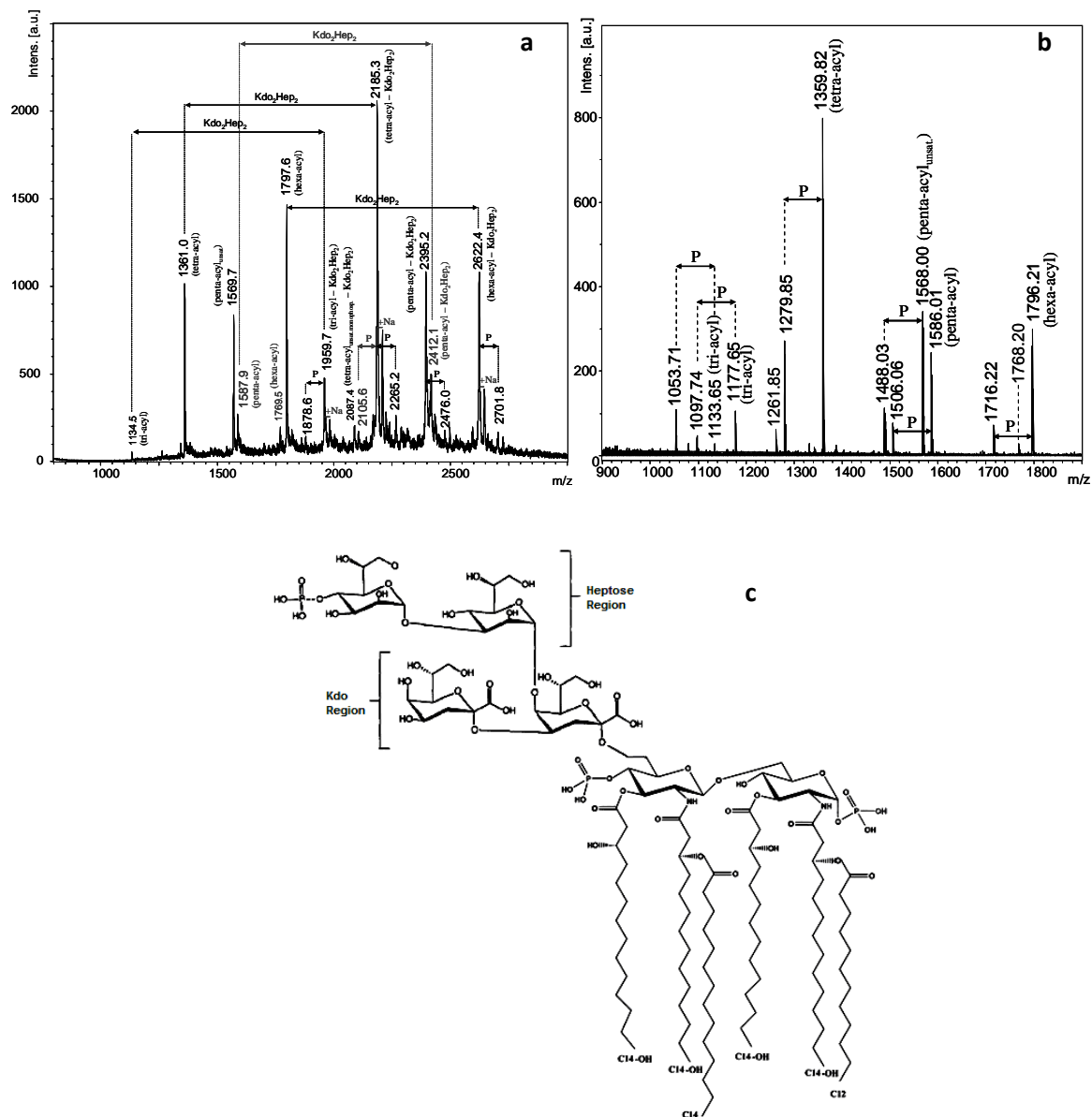
4.3. Endotoxin analízis MALDI-TOF tömegspektrométerrel

Az endotoxin vizsgálatok körébe tartozik egy másik nagy kihívást jelentő terület, nevezetesen az LPS molekulák kémiai mikroheterogenitásának tanulmányozása, ami a bakteriális fertőzés patogenezisével kapcsolatos folyamatok megértéséhez szükséges. Intakt LPS-ek részletes szerkezeti elemzésére alkalmasak a tömegspektrometriás és NMR vizsgálatok.

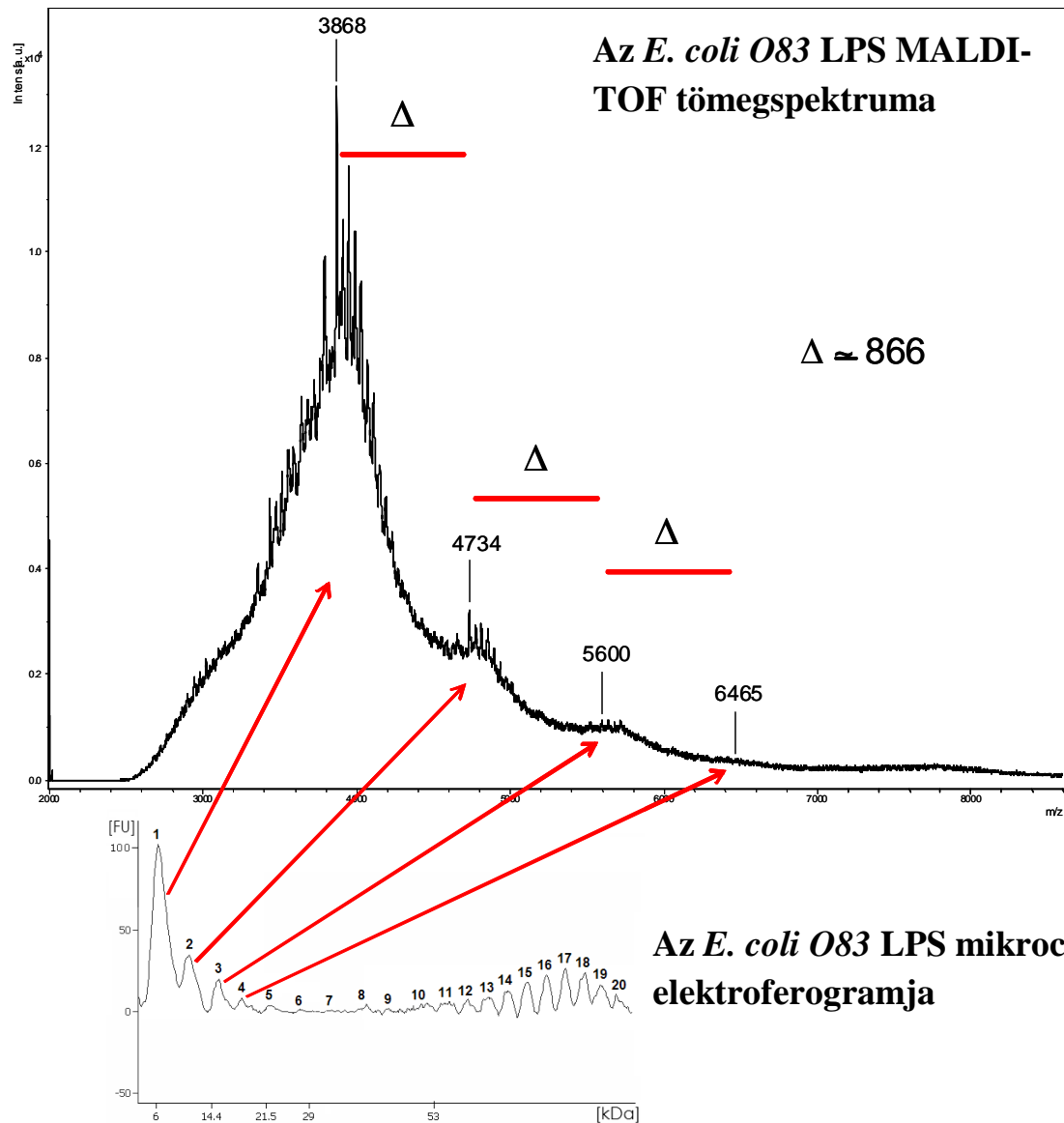
Kísérleteinkben MALDI-TOF tömegspektrométert alkalmazva a következő törzsekből izolált intakt endotoxinokat vizsgáltuk MALDI-TOF tömegspektrométerrel: *R* típusú *S. minnesota* R595, *S. sonnei* 4303, R41, 562H, 4350 (mutáns variánsok) és *S* típusú *E. coli* O83. Vizsgáltuk még az *E. coli* O83, O112, O157, *P. morganii* O34, *S. urbana* O30 és *S. sonnei* R41 törzsek endotoxinjaiból savas hidrolízis útján nyert lipid A szerkezeteket.

A 7. és 8. ábrán egy *R* és egy *S* típusú endotoxin tömegspektruma látható.

Az endotoxin molekulák a tömegspektrométer ionforrásában kis gerjesztési energia hatására is hasadhatnak i) a lipid A és core oligoszacharid közti glikozidkötés mentén, illetve ii) a glükózamin maradék és egyes zsírsav láncok között. Az LPS molekulaion, a core oligoszacharid fragmens ionjai és a lipid A fragmens ionjai a tömegspektrumban – a nagyfokú LPS (mikro)heterogenitás következtében – csúcshalmazok formájában jelennek meg.



7. ábra *S. sonnei* R41 intakt LPS lineár módban felvett (a), és *S. sonnei* R41 lipid A reflektrom módban felvett negatív ion MALDI-TOF tömegspektruma (b); a *S. sonnei* R41 intakt LPS tömegspektrum alapján javasolt szerkezete (c).



8. ábra Az *E. coli* O83 LPS negatív-ion MALDI-TOF tömegspektrumának és mikrochip elektroforetikus képének összevetése. Az elektroferogramban az első (számozott) csúcshoz hozzárendelhető a lipid A és core részt tartalmazó LPS komponens, míg a többi, nyíllal jelzett csúcs feltételezhetően a leginkább ionizálható, 0, 1, 2 és 3 O-poliszacharid ismétlődő egységet tartalmazó LPS komponensek csúcsai. A tömegspektrumban e csúcsok közti tömegkülönbség egyenlő az O-oldallánc ismétlődő egységeinek tömegével ($\Delta m/z = 866$ Da). A mikrochip elektroferogramban megjelenő csúcsok számából következtetni lehet az intakt LPS-ben jelenlevő O-poliszacharid ismétlődő egységek számára. Ennek alapján az *E. coli* O83 LPS legtöbb (19) ismétlődő egységet tartalmazó komponensének molekulatömege kb. 20328 Da.

5. Következtetések és lehetőségek

A bakteriális lipopoliszacharidok (endotoxinok) szerkezeti elemzése fontos szerepet játszik a baktériumok azonosításában és a különböző mutánsok jellemzésében. Munkánk során új, gyors és nagy érzékenységű kapilláris- és mikrochip elektroforézis módszereket vezettünk be számos, az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumtörzsekből kivont endotoxinok detektálására és mennyiségi analízisére. Az intakt LPS-ek fajon belüli heterogenitásának felderítésére MALDI-TOF tömegspektrometriás méréseket alkalmaztunk.

Új eredmények:

1. A kapilláris elektroforézis, és a mikrochip elektroforézis egyaránt alkalmasnak bizonyult az endotoxinok szerkezeti változatainak tanulmányozásához, különösen az *S* és *R* kemotípusok gyors és érzékeny megkülönböztetéséhez.
2. A kapilláris elektroforézissel lehetséges a fehérje/LPS komplexek vizsgálata vizes rendszerekben és az elektroferogram képe függ az endotoxin kemotípusától.
3. Az endotoxinok analízisére újonnan kifejlesztett mikrochip technika egyszerű és gyors (11 minta futtatása 30 percet igényel, mintaelőkészítéssel együtt 1 óra), nagy érzékenységű, (egy minta futtatásához kevesebb, mint 1 nanogram LPS elegendő), alkalmas kis mennyiségű minták vizsgálatára (pikoliternyi mennyiségek injektálása), fontos szerkezeti információt nyújt az endotoxinokról (alkalmas az *S* és *R* típusú LPS-ek megkülönböztetésére). A nagy felbontású módszerrel az *S* típusú endotoxinok különböző O-oldallánc ismétlődő egységet tartalmazó komponensek mikrochipben történő szétválasztása és relatív mennyiségének meghatározása is lehetséges.
4. Az említett előnyök miatt a mikrochip módszerünk kiválthatja a hagyományosan használt, ám idő- és munkaigényes ezüstözéssel kombinált SDS-poliakrilamid gél-elektroforézist, ami nagy előrelépést jelent az endotoxinok analízisében.
5. A mikrochip technika karakterisztikus profilokat szolgáltat a különböző baktériumtörzsekből származó endotoxinokra. Így alkalmas az LPS kemotípusok nagyon gyors „ujjlenyomat”-vételére nagyszámú baktérium mutánsokból származó sejtlizátumok vizsgálatában.
6. A MALDI tömegspektrumok alapján következtetni lehet az egyes LPS-ek pontos lipid és poliszacharid összetevőinek minőségére és mennyiségére.
7. A tömegspektrometriás méréseket elektroforetikus mikrochipelemzésekkel kombinálva meghatározható a kis molekulatömegű LPS komponensek szerkezete és molekulatömege. A lipopoliszacharidok kémiai összetételének meghatározása fontos információt ad a szerkezet – funkció kapcsolat tisztázásához.

Tervek

- A jövőben továbbfejleszteni a kapilláris elektroforézis módszert annak érdekében, hogy a kis szerkezeti különbségekkel rendelkező endotoxinok is megkülönböztethetők legyenek.

- Az eredeti mikrochip elektroforetikus profilban megjelenő rendszercsúcs kiküszöbölése, mert ez a csúcs zavarja az *R* típusú endotoxinok mennyiségi értékelését.
- Ismert kémiai szerkezetű LPS molekulák molekulatömeg standardként való alkalmazásának kidolgozása az endotoxinok molekulatömegeinek meghatározásához elektroforetikus futtatásokban.
- A MALDI tömegspektrometriás mérések folytatása a nagyszámú ismétlődő egységgel rendelkező molekula-komponensek szerkezetének meghatározására.

6. Publikációs lista

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

Kilár, A., Kocsis, B., Kustos, I., Kilár, F., Hjertén, S.: CE to monitor endotoxins by protein complexation. *Electrophoresis* 27 (2006) 4188 – 4195. IF: 4.101, idézettség (független): 3 (2)

Kilár, A., Farkas, F., Kovács, K., Kocsis, B., Kilár, F.: Novel quantitative electrophoretic analysis of endotoxins on microchips *Electrophoresis* 29 (2008) 1713-1722. IF: 3.509 idézettség (független): 1 (0)

Kilár, A., Péterfi, Z, Csorba, E., Kilár, F., Kocsis, B.: Capillary electrophoresis chips for screening of endotoxin chemotypes from whole-cell lysates. *Journal of Chromatography A* 1206 (2008) 21-25. IF: 3.756

Bui, A., **Kilár, A.,** Dörnyei, Á., Szabó, Z., Poór, V., Kovács, K., Kocsis, B., Kilár, F.: Structural variability of endotoxins from R type isogenic mutants of *Shigella sonnei*. *Journal of Chromatography A* (2009) – közlésre elküldve

Az értekezéshez kapcsolódó előadások

Kilár, A., Farkas, V., Kocsis, B., Kilár, F.: Development of two electrophoretic methods for the analysis of bacterial lipopolysaccharides
7th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Június 10-15, Pécs, Magyarország, 2007

Kilár, A., Farkas, V., Kilár, F., Kocsis, B.: Endotoxin analysis by electrophoresis and chip technology
15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Július 18-20, Budapest, Magyarország, 2007

Kilár, A.: Az endotoxinok biológiai és kémiai különlegességei
XXXIX. Kromatográfia Továbbképző Tanfolyam, Január 28-30, Szeged, Magyarország 2008

Kilár, F., Bui, A., **Kilár, A.,** Kocsis, B., Szabó, Z., Farkas, V.: Study of structure-function relationship in endotoxin analysis by microchips and mass spectrometry
22nd International Symposium on Microscale Bioseparations, Március 9-13, Berlin, Németország, 2008

Kilár, F. Bui, A., **Kilár, A.,** Kocsis, B., Szabó, Z., Farkas, V.: Analysis of endotoxins by mass spectrometry and microchips
8th Csaba Horváth Medal Award Symposium, Április 14-15, Innsbruck, Ausztria, 2008

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

Kilár, A., Péterfi, Z., Csorba, E., Kilár, F., Kocsis, B.: Capillary electrophoresis chips for screening of endotoxin chemotypes from whole-cell lysates
9th International Symposium on Instrumental Analysis, Június 29 – Július 2, Pécs, Magyarország, 2008

Kilár, A., Bui, A., Szabó, Z., Dörnyei, Á., Kocsis, B., Kilár, F.: Analysis of endotoxin structures by MALDI-MS
XIV. Nemzetközi Vegyészkonferencia, November 13-15, Kolozsvár, Románia, 2008

Az értekezéshez kapcsolódó poszterek

Kilár, A., Kustos, I., Kocsis, B., Kilár, F., Hjertén, S.: Analysis of lipopolysaccharide - hemoglobin complexes by capillary electrophoresis
8th Symposium on Instrumental Analysis, Szeptember 25-28, Graz, Ausztria, 2005

Kilár, A., Kustos, I., Kocsis, B., Kilár, F., Hjertén, S.: Lipopoliszacharid - hemoglobin komplexek vizsgálata kapilláris elektroforézissel
XI. Nemzetközi Vegyészkonferencia, November 11-13, Kolozsvár, Románia, 2005

Kilár, A., Kustos, I., Kocsis, B., Kilár, F., Hjertén, S.: Analysis of lipopolysaccharide - hemoglobin complexes by capillary electrophoresis
15th International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques, Augusztus 28-30, Párizs, Franciaország, 2006

Kilár, A., Farkas, V., Kilár, F., Kocsis, B.: Microchip Electrophoresis for the Analysis of Bacterial Endotoxins
7th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Szeptember 5-7, Siófok, Magyarország, 2007

Kilár, A., Kovács, K., Kocsis, B., Kilár, F.: Endotoxin Analysis on Microchip – Application of a New Method
22nd International Symposium on Microscale Bioseparations, Március 9-13, Berlin, Németország, 2008

Makszin, L., **Kilár, A.**, Kocsis, B., Kilár, F.: Bakteriális endotoxinok gyors és érzékeny microchip elektroforetikus kimutatása
Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2008, November 5-7, Sárvár, Magyarország, 2008

Makszin, L., **Kilár, A.**, Bui, A., Szabó, Z., Dörnyei, Á., Farkas, V., Kocsis, B., Kilár, F.: Fast and extremely sensitive detection of bacterial endotoxins in microchip electrophoresis
23rd International Symposium on Microscale Bioseparations, Február 1-5, Boston, USA, 2009

Dörnyei, Á., **Kilár, A.**, Kocsis, B., Kilár, F.: Application of mass spectrometry to the characterization of bacterial lipopolysaccharides
8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods and 15th International Symposium on Separation Sciences, Szeptember 2-4, Siófok, Magyarország, 2009

Egyéb publikációk

Takátsy, A., **Kilár, A.**, Kilár, F., Hjertén, S.: Universal method for synthesis of „artificial gel antibodies” by the imprinting approach combined with a unique electrophoresis technique for detection of minute structural differences of proteins, viruses, and cells (bacteria): Ia. Gel antibodies against proteins (transferrins). *Journal of Separation Science* 29 (2006) 2802-2809. IF: 2.535, idézettség (független): 7 (2)

Péterfi, Z., Ósz, E., Reuter, G., **Kilár, A.**, Kilár, F., Kocsis, B.: Structural properties of O-specific polysaccharide extracted from *Proteus morganii* O34 (8662/64) possessing serological cross-reactivity with *Escherichia coli* O111 and *Salmonella adelaide* O35, *kézirat*

Kilár, A., Dibó, G., Hjertén, S.: Studies of the selective interaction between aromatic compounds and polysaccharides, *kézirat*

Egyéb előadások

Bacsokay, I., Takátsy, A., Kilár, F., Sedzik, J., **Kilár, A.**, Hjertén, S.: „Synthetic antibodies” and their Application to Analysis and Purification of Macromolecules and Particles.

"100 Years of Chromatography" 3rd Int. Symposium on Separations in BioSciences, Május 13-18, Moszkva, Oroszország, 2003

Kilár, A., Dibó, G., Hjertén, S.: Studies of the Selective Interaction between Aromatic Compounds and Polysaccharides

4th Nordic Separation Science Society International Conference Augusztus 26-29, Kaunas, Litvánia, 2007

Hjertén, S., Végvári, Á., Nyberg, F., Ghasemzadeh, N., **Kilár, A.**: A short tour in our research laboratory

4th Nordic Separation Science Society International Conference, Augusztus 26-29, Kaunas, Litvánia, 2007

Kilár, F., Gagyi, L., **Kilár, A.**, Páger, Cs., Kuti, P., Hodrea, J., Sági, Cs., Szécsényi, M., Gyéresi, Á., Kocsis, B., Kustos, I., Hjertén, S.: Effect of chemical structure on molecular recognition by proteins followed by capillary electrophoresis

15th International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques, Augusztus 28-30, Párizs, Franciaország, 2006

Egyéb poszterek

Kilár, A., Dibó, G., Hjertén, S.: Aromás vegyületek és poliszacharidok kölcsönhatásának vizsgálata kapilláris elektroforézissel

IX. Nemzetközi Vegyészkonferencia, November 14-16, Kolozsvár, Románia, 2003

Egyéb idézhető absztrakt

Hjertén, S., Ghasemzadeh, N., Hjertén, M.-C., Végvári, Á., Bacsokay, I., **Kilár, A.**, Rezeli, M., Takátsy, A., Kilár, F., Ballagi, A., Elfving, A., Cheng, H., Sedzik, J., Aastrup, H., Andersson, H.: Universal method for synthesis of highly selective „artificial gel antibodies” against proteins, viruses and cells; some techniques to study the selectivity and applications. *FEBS Journal* 272 (2005) 399-399. IF: 3.164

Közlemények összesített impakt faktora (tézishez kapcsolódó): 13.901 (11.366)

Idézhető absztrakt impakt faktora: 3.164

Összes idézettség (független idézettség): 11 (4)