

Akrilamid-alapú elválasztási töltetek

PhD értekezés tézisei

Rezeli Melinda

Témavezetők:

Prof. Kilár Ferenc
Prof. Stellan Hjertén

Pécsi Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Kémia Doktori Iskola

2008

Bevezetés

A dolgozat alapjául szolgáló munka célja olyan akrilamid-alapú töltetek kifejlesztése volt, amelyek fehérjék analízisében használhatók. Akrilamid, illetve különböző akrilamid-származékok meghatározott körülmények között végzett polimerizációjával egyedi tulajdonságokkal rendelkező polimerek állíthatók elő. A felhasznált monomerek mennyiségének és minőségének változtatásával, különböző adalékanyagok hozzáadásával és a polimerizáció körülményeinek megváltoztatásával a keletkező polimerek fizikai és kémiai sajátosságai tág határok között változtathatók. A rendelkezésre álló monomerek változatossága miatt, illetve a polimer utólagos kémiai módosításával hidrofil, hidrofób, semleges és ionos csoportokat tartalmazó polimerek egyaránt készíthetők. Ezeknek a polimereknek egy része makroszkopikusan homogén, teljesen átlátszó, mint például a poliakrilamid gélek és az akrilamid-alapú polimeroldatok. Míg a másik csoportba tartozó polimerek nem tekinthetők teljesen homogénnek, opálosak vagy teljesen átlátszatlanok, mivel kisméretű (szubmikronos) részecskékből épülnek fel, melyek kovalens kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz. Ilyenek az akrilamid-alapú monolitok. A változatos tulajdonságoknak köszönhetően az akrilamid-alapú polimerek felhasználási köre nagyon széles.

Célkitűzések

Munkánk során új, akrilamid-alapú polimerek kifejlesztését kívántuk elérni, melyeket elektroforetikus és kromatográfias elválasztó rendszerekben, fehérjék analízisére használhatunk.

A következő célokat tűztük ki:

- Akrilamid-alapú homogén gél kifejlesztése (protonálható csoportot tartalmazó monomer felhasználásával), mely alkalmas híg fehérjeminták koncentráálására, ill. olyan gélrendszer készítése, amely fehérjék koncentráálására és elválasztására használható.
- Megújuló poliakrilamid enzimreaktor készítése mesterséges poliakrilamid gél antitestek felhasználásával.

- Fehérjék (hemoglobin) szelektív felismerésére és megkötésére képes, kromatográfiás monolit töltet kifejlesztése molekuláris imprinting technikával.

Anyagok és módszerek

Poliakrilamid gélek elektroforézishez

Elektroforézishez használatos poliakrilamid géleket készítettünk az irodalomban korábban leírt módszer szerint. A monomereket, illetve azok koncentrációját változtattuk. A polimerizáció a következő séma alapján történt:

A monomereket (akrilamid, vagy akrilamid és 2-morfolino-etilakrilamid (*Acrylamido buffer pK 6.2*)) és a keresztkötőt (*N,N'*-metilén-bisz-akrilamid) 0,02 M nátrium-foszfát pufferben (pH 6.8) oldottuk fel. A polimerizáció elindításához ammónium-perszulfátot (APS) és *N,N,N',N'*-tetrametil-etiléndiamint (TEMED) adtunk a gáztalanított oldathoz. A monomeroldatot azonnal 5 mm belső átmérőjű üvegcsőbe pipettáztuk, amelynek az alját előzőleg dialízis membránnal zártuk le. A monomeroldat tetejére izopropil alkoholt rétegeztünk, így elkerülhető volt az oxigénnel való érintkezés (amely gátolja a polimerizációt), valamint sima gélfelszínt kaptunk, ami fontos volt a jól definiálható kezdőzóna kialakításához.

Az elektroforézist vertikális elektroforézis készülékben végeztük, amelyhez tápegységet kapcsolunk. A komponensek vándorlása szabad szemmel követhető volt, mivel színes (fikoeritrin), ill. festett fehérjét (brómfenolkékkel festett szérumalbumin) használtunk mintaként. A koncentráció és elválasztás lépéseit digitális fényképek segítségével dokumentáltuk.

Akrilamid-alapú polimerek fehérjék szelektív felismerésére

A szelektív polimerek szintéziséhez semleges monomereket, akrilamidot és metakrilamidot; keresztkötőként pedig *N,N'*-metilén-bisz-akrilamidot és piperazindiakrilamidot használtunk. A polimeroldat a templátként használt fehérjét (β -galaktozidáz, hemoglobin) is tartalmazta. A gyökös mechanizmusú polimerizációhoz katalizátorként ammónium-perszulfátot (APS), iniciátorként *N,N,N',N'*-tetrametil-etiléndiamint (TEMED) alkalmaztunk.

A szelektív poliakrilamid gélt 2-5 ml térfogatban, üvegcsőben készítettük. A kialakult gélt aztán különböző lyukméretű (60 és 100 lyuk/cm²) fémhálókön préseltük át, így 0.1-0.3 mm átmérőjű gélgranulákat kaptunk.

A szelektív monolitot közvetlenül 6 mm belső átmérőjű kromatográfiás oszlopban (Plexiglas) polimerizáltattuk.

A templátként használt fehérjék eltávolítása a poliakrilamid gélgranulák esetén SDS elektroforézissel, a monolit oszlop esetén nátrium-dodecilszulfát (SDS) tartalmú pufferes mosással történt.

A polimerek működését, szelektivitását közvetett módszerekkel ellenőriztük. Enzimaktivitást vizsgáltunk (β -galaktozidáz esetén) és kationcserélő kromatográfiás elválasztást végeztünk.

Eredmények és következtetések

Mintakonzentrálás protonálható csoportot tartalmazó poliakrilamid gélben

Olyan koncentráló módszert dolgoztunk ki, amelynek a lényege a fehérjék megkötése elektrosztatikus kölcsönhatás révén. Az eljárást savas karakterű fehérjék poliakrilamid gél elektroforézisében alkalmaztuk. A koncentráláshoz használt gél bázikus csoportokat tartalmazott, ezáltal gyenge anioncserélőként működött. A monomerként használt gyenge bázist (2-morfolino-etilakrilamid) úgy kellett megválasztanunk, hogy a pK értéke magasabb legyen, mint a mintafehérjék (fikoeritrin, albumin) izoelektromos pontja. Az alkalmazott puffer pH-jának megfelelő megválasztásával, ill. változtatásával értük el a mintafehérjék koncentrálását és ezt követően az elválasztásukat.

A módszer elve a következőképpen foglalható össze:

A koncentráló lépés alacsony pH-n történik, ekkor a gél bázikus csoportjainak döntő többsége protonált formában van jelen, míg a fehérjék nettó töltése negatív. Az anód felé vándorló fehérjék a koncentráló gélbe jutva lelassulnak és megkötődnek az erős elektrosztatikus vonzóerő következtében. A pH emelésével a pozitívan töltött, gyengén bázikus csoportok aránya csökken. A monomer pK értékénél egy egységgel magasabb pH-n már nagyon kicsi a protonált csoportok aránya, tehát magas pH-n

megtörténik a fehérjemolekulák deszorpciója, és a koncentrált zóna tovább vándorolhat a semleges poliakrilamid gélben az anód felé.

Komplex gérendszer készítettünk (védő, koncentráló és szeparáló gél), melyben megvalósítható a fehérjeminta koncentrációja és ezt követően az egyes komponensek elválasztása is.

Az általunk kísérletesen igazolt módszer savas karakterű fehérjék koncentrálására alkalmas, de ugyanezen elv alapján a bázikus fehérjék dúsítása is megvalósítható. Ebben az esetben a koncentráló gélnek gyengén savas csoportokat kell tartalmaznia, melyek magas pH-n deprotonálódnak és így elektrosztatikus kölcsönhatást alakítanak ki a pozitív töltésű fehérjemolekulákkal, megkötik azokat. Alacsonyabb pH-n viszont csökken a gél negatív töltésű csoportjainak aránya, így az „elengedi” a fehérjéket, és a koncentrált zóna tovább vándorolhat a katód irányába.

A különböző pK értékkel rendelkező, gyengén savas vagy bázikus csoportot tartalmazó akrilamid-származékok nagy száma lehetővé teszi a módszer széleskörű alkalmazását a megfelelő pufferrendszer alkalmazása mellett.

Szelektív polimerek molekuláris lenyomatkészítéssel

Mesterséges polimer antitesteket készítettünk különböző fehérjék ellen molekuláris lenyomatkészítési technikával. A molekuláris lenyomatkészítés funkcionális, vagy semleges monomerek és keresztkötők, templát molekula jelenlétében történő polimerizációját jelenti. A templát eltávolítása után a képződött polimerben visszamaradó felismerő helyek komplementerek a templáttal. A polimer tehát képes az adott molekula felismerésére és megkötésére. Az általunk használt technikát Hjertén és csoportja dolgozta ki [Liao *et al.*, 1996]. A szintézis lényege, hogy a lenyomatkészítés során a polimerhez funkcionális monomerek helyett, melyek töltésüknél fogva részt vehetnek nem specifikus kölcsönhatások kialakításában és ezáltal csökkenthetik a polimer szelektivitását, semleges monomereket, például akrilamidot és keresztkötőként bisz-akrilamidot használunk. A semleges, hidrofil poliakrilamid gél nem specifikus kölcsönhatásai fehérjékkel elhanyagolhatóak. A szelektív felismerés (1) az antigén és a lenyomat közti pontos illeszkedésen, valamint (2) az antigén és a polimer között kialakuló kötések számán és típusán alapul. A módszer univerzális, hiszen eredetileg fehérjékre fejlesztették ki,

de később minimális változtatásokkal (pl. a templát eltávolításának módja) baktériumokra [BacsKay *et al.*, 2006] és vírusokra [Takátsy *et al.*, 2006] is sikeresen alkalmazták. Fontos hangsúlyozni azt is, hogy a legtöbb lenyomat-készítési technikával ellentétben esetünkben a polimer szintézise vizes közegben történik, ami fehérjék használatakor különösen fontos és előnyös.

A mesterséges antitestekről elmondható, hogy szintézisük egyszerű, idő-, és költségkímélő, emellett olyan antigének ellen is készíthetők, amelyek ellen természetes antitest termelése egyáltalán nem, vagy csak nehezen oldható meg. Ezek a mesterséges polimerek fizikai, kémiai hatásokkal szemben (hőmérséklet, pH, nyomás vagy szerves oldószerek) sokkal ellenállóbbak, mint természetes társaik. Szelektív memóriájukat hosszú távon megőrzik, újra és újra felhasználhatók anélkül, hogy a szelektivitásukban számottevő romlás következne be.

A korábbi publikációk két lehetséges alkalmazási területét mutatták be az ilyen technikával készített mesterséges antitesteknek. Egy vagy több kiválasztott komponens eltávolítása egy komplex keverékből, illetve az „antigén/gél antitest”-komplex elektroforetikus analízisével extrém kis konformációs különbségek kimutatása.

Munkánk során a szelektív polimereket további két új területen alkalmaztuk.

1. Megújítható enzimreaktor szelektív poliakrilamid gélgranulákból

Az akrilamid és bisz-akrilamid felhasználásával készült poliakrilamid gél antitestekhez β -galaktozidáz enzimet használtunk templátként. Korábbi eredmények alapján tudtuk, hogy szelektív poliakrilamid gélek esetén a templátmolekula (enzim) és a gél között gyenge másodrendű kötések, elsősorban hidrogén-kötés, dipól-dipól kölcsönhatás és apoláris kölcsönhatás alakulnak ki. Az „antigén/gél antitest” komplexek korábbi elektroforetikus vizsgálatai azt mutatták, hogy a kialakult komplexek stabilak, vagyis a szelektív gél erősen köti a megfelelő templát molekulát. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a kötések száma elég nagy ahhoz, hogy a kapcsolódás az enzim és a lenyomata között a gélben stabil legyen, ugyanakkor az enzim megőrizze működőképességét. A β -galaktozidáz enzimmel inkubált gélgranulákhoz színtelen, *o*-nitrofenil- β -D galaktopiranozid szubsztrátot adva, azonnal megjelent a sárga színű *o*-nitrofenol termék, ami bizonyítja az aktív enzim jelenlétét a gélgranulákban, ill. azok felszínén.

A szelektív poliakrilamid gélgranulákat oszloptöltetként használva enzimreaktort készíthetünk. Mivel az enzim reverzibilis kötésekkel kapcsolódik a polimerhez, az enzimreaktor regenerálható. A szelektív gél-alapú enzimreaktorok előnye más regenerálható reaktorokkal szemben, hogy akár tisztítatlan enzimet is használhatunk a regeneráláshoz, ugyanis a nagy szelektivitásuknak köszönhetően, a gél szemcsék csak azt az enzimet ismerik fel, ill. kötik meg, amely jelen volt a polimerizációnál, más fehérjéket, enzimeket nem.

Kísérleteinkben β -galaktozidáz enzimet használtunk, de várhatóan molekuláris lenyomatkészítési technikánkkal más enzimek felismerésére és megkötésére alkalmas poliakrilamid gél antitestek is készíthetők. Amennyiben sikerül kiküszöbölni a lágy poliakrilamid gél előnytelen kromatográfiai tulajdonságait az imprinting technikával készített mesterséges antitestek jól használhatók megújítható enzimreaktorok tölteteként.

2. Hemoglobint szelektíven felismerő/megkötő monolit oszlop

A szelektív monolit készítéséhez semleges monomereket, metakrilamidot és piperazin-diakrilamidot használtunk fel. A polimerizáció vizes közegben, gyökös mechanizmusú láncreakció során ment végbe ammónium-szulfát, mint porogén és hemoglobin, mint templát jelenlétében (a kontrol esetén hemoglobin nélkül). A kis koncentrációban jelenlévő só fokozza a hidrofób kölcsönhatást, ezáltal előidézi a növekvő polimerláncok aggregációját. Az aggregátumok között kialakuló csatornák teszik lehetővé, a folyadéktranszportot a polimeren keresztül, vagyis a monolit kromatográfiai alkalmazását. Monolitunkat *in situ*, egy lépésben az oszlopban készítettük és magasnyomású folyadékkromatográfiai (HPLC) rendszerben használtuk. A templátként használt fehérje eltávolítása után (a kontrol oszlopot azonos módon kezeltük), ellenőriztük az oszlop szelektivitását. Azonos térfogatú és összetételű fehérjekeveréket (hemoglobin, citokróm c, ribonukleáz A) injektáltunk mind a szelektív, mind a kontrol oszlopra; majd eluáltuk és frakciókat gyűjtöttünk. Az egyes oszlopokról származó frakciók összetételét kationcserélő kromatográfiával határoztuk meg. A hemoglobin jelenlétében polimerizált töltet képes volt felismerni és megkötni a hemoglobint, míg a másik két fehérjét (citokróm c, ribonukleáz A) nem. A kontrol oszlopnak ezzel szemben nincs szelektív tulajdonsága, hiszen mindhárom injektált fehérje csúcsa megjelent a kromatogramon, tehát nem adszorbeálódtak az oszlopon.

Az általunk készített szelektív monolit kötőkapacitása kicsi (~60-65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hb). A polimer kapacitását a polimerizáció körülményeinek változtatásával (templát mennyisége, monomerek, iniciátor, katalizátor koncentrációja, puffer pH-ja, ionerőssége stb.) befolyásolhatjuk. A maximális kapacitás eléréséhez szükséges paraméterek azonban templáttól, azaz a célfehérjétől függően változnak, így ezeket minden fehérjére külön kell optimalizálni.

A monolit oszlop készítéséhez hemoglobint használtunk templátként, mert olcsó, könnyen hozzáférhető és mivel színes, szabad szemmel is nyomon követhető. Az imprinting technika alkalmazásával várhatóan más fehérjék, mint pl. transzferrin, mioglobin szelektív felismerésére és megkötésére alkalmas monolit is készíthető. A monolitok előnyei, hogy bármilyen átmérőjű oszlopban (kapilláris, chip) *in situ* polimerizáltathatók, kovalensen köthetők az oszlop falához, kicsi az ellenállásuk és a felbontás független az áramlási sebességtől. Az általunk készített szelektív monolit töltetet más tulajdonságú monolitokkal (pl. ioncserélő, fordított fázisú töltet) kombinálva komplex elválasztások válnak lehetővé.

Összefoglalás

Elektroforetikus és kromatográfias elválasztási rendszerekben használható, akrilamid-alapú polimereket készítettem. Az általam alkalmazott/kidolgozott technikák alapja a polimerek és a mintaként használt fehérjék között kialakuló kölcsönhatás. Ez lehet szelektív vagy nem szelektív kölcsönhatás.

Poláris (vagy apoláris) ligandumokat tartalmazó polimerek erős elektrosztatikus (vagy hidrofób) kölcsönhatásokat képesek kialakítani a fehérjék hasonló tulajdonságú csoportjaival. Az így kialakult kötések nem szelektívek, azaz egy adott polimer, amely ilyen típusú ligandumokat tartalmaz több, különböző szerkezetű fehérje megkötésére is alkalmas.

- Gyengén bázikus csoportokat tartalmazó poliakrilamid gélt készítettem 2-morfolino-etilakrilamid monomer felhasználásával. Alacsony pH-n ezek a csoportok nagyrészt protonált formában vannak jelen, tehát erős elektrosztatikus kölcsönhatást alakíthatnak ki negatív töltésű fehérjemolekulákkal. A pH emelésével a protonáltság, és ezáltal a kölcsönhatás

erőssége is csökken, ill. megszűnik. Tehát a megfelelő pufferrendszer alkalmazása mellett a gél felhasználható híg fehérjeminták koncentrálására, amit poliakrilamid gél elektroforézis rendszerben kísérletekkel igazoltam.

Polimer és fehérje között szelektív kölcsönhatások is kialakíthatók, molekuláris lenyomatkészítési technikával (molecular imprinting). A fehérje és lenyomata között a pontos illeszkedésnek és a kialakuló gyenge, másodrendű kötéseknek köszönhetően szelektív kölcsönhatás/felismerés jön létre.

- β -galaktozidáz enzim szelektív felismerésére és megkötésére képes poliakrilamid gél granulákat használtam fel enzimreaktor készítéséhez. Az így elkészített reaktor az elhasználandó enzim eltávolítását követően, friss enzimmel inkubálva regenerálható. A mesterséges gél antitestek nagy szelektivitásának köszönhetően az oszlop regenerálásához nem szükséges tisztított enzim, mert a gél csak a polimerizációnál jelenlevő enzimet ismeri fel, ill. köti meg egy keverékből.
- Szelektív gél technikával hemoglobin felismerésére képes monolit töltetet készítettem metakrilamid és piperazin-diakrilamid felhasználásával. A semleges polimert *in situ*, kromatográfiás oszlopban készítettem, amelyet közvetlenül használhattam kromatográfiás célokra. (A poliakrilamid gélekkel szemben, monolitok esetén nincs szükség granulálásra.)

Munkám elsősorban arra irányult, hogy új összetételű polimereket készítsék, illetve a már ismert, speciális tulajdonságú polimerek alkalmazási területét bővítsem. Arra törekedtem, hogy a polimerek alkalmazási lehetőségeit a legegyszerűbb eszközök segítségével mutassam be. A dolgozatban ismertetett kísérletek egy-egy jelenséget hivatottak bemutatni, a módszerek optimalizálása, speciális körülményekre történő adaptálása egy további lépés.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Rezeli M, Kilár F, Hjertén S, Monolithic beds of artificial gel antibodies. (2006) *J. Chromatogr. A* 1109: 100-102. **IF-2006: 3.554**

Rezeli M, Kilár F, Hjertén S, (2008) A new approach for on-line enrichment and electrophoresis of dilute protein solutions. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70: 1098-1103. **IF-2006: 1.403**

Hjertén M, **Rezeli M**, Kilár F, Hjertén S, (2008) Renewable enzyme reactors based on beds of artificial gel antibodies. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70: 1188-1191. **IF-2006: 1.403**

Az értekezés alapjául szolgáló előadás és poszter absztraktok

Idézhető absztrakt:

Hjertén S, Ghasemzadeh N, Hjertén MC, Végvári A, Bacskay I, Kilár A, **Rezeli M**, Takátsy A, Kilár F, Ballagi A, Elfving A, Cheng H, Sedzik J, Aastrup T, Anderson 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* (2005) 272: 399-399.

Konferencia kiadványban megjelent absztraktok:

Ghasemzadeh N, Kilár A, **Rezeli M**, Takátsy A, Végvári Á, Kilár F, Hjertén S, Novel approaches in the synthesis of artificial antibodies and in the detection of the antigens (proteins, viruses and cells). 6th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2005, Siófok, Hungary, Book of Abstracts, L-12

Rezeli M, Kilár F, Hjertén S, Mesterséges antitestek - Fehérjefelismerés monolit tölteteken. XII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, 2006, Csíkszereda, Románia, Doktorandusz plénum, 102. old.

Rezeli M, Kilár F, Hjertén S, Monolithic beds of artificial gel antibodies. 6th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2005, Siófok, Hungary, Book of Abstracts, P-52

Rezeli M, Takátsy A, Bacskay I, Ghasemzadeh N, Végvári Á, Sedzik J, Ballagi-Pordány A, Kilár F, Hjertén S, Artificial antibodies-selective gels for macromolecules and bioparticles. 15th International Symposium on Capillary Electro-separation Techniques, 2006, Paris, France, Program and book of abstracts, P-37

Egyéb közlemények

Rezeli M, Világhy B, Kilár F, Kanyó K, Török B, Török A, (2002) Significant differences in capillary electrophoretic patterns of follicular fluids and sera from women pre-treated for in vitro fertilization. *J. Biochem. Biophys. Methods* 53: 151-156. **IF-2002: 1.383**

Surowiec I, Pawelec K, **Rezeli M**, Kilár F, Trojanowicz M, (2008) Capillary electrophoretic determination of main components of natural dyes with MS detection. *J. Sep. Sci. (elfogadva)* **IF-2006: 2.535**

Farkas V, **Rezeli M**, Végvári Á, Kilár F, Hjertén S, A new approach to determine the variance of reversible adsorption of an analyte onto the capillary wall in CE with electroosmotic flow and the loss caused by irreversible adsorption. (*kézirat*)

Egyéb előadás és poszter absztraktok

Rezeli M, Szignifikáns különbségek szérum és folliculus folyadék fehérjeprofiljában hormonkezelésen átesett nők esetén. XXVI. OTDK Kémiai és Vegyipari szekció, 2003 Budapest

Farkas V, **Rezeli M**, Végvári Á, Kilár F, Hjertén S, Novel approaches for quantitative determination of the reversible and irreversible adsorption of analytes onto the channel wall in capillary and microchip electrophoresis with electroosmotic flow. 22nd International Symposium on MicroScale Bioseparations & Methods for Systems Biology, 2008, Berlin, Germany, Abstracts Book, pp. 72

Rezeli M, Világhy B, Kilár F, Török B, Török A, Significant differences in the electrophoretic patterns of follicular fluids and sera from women pre-treated for in vitro fertilization. HPCE 2002, 15th International Symposium on Microscale Technique, 2002, Stockholm, Sweden, Abstracts, P-41

Kőnigné Péter A, **Rezeli M**, Kilár F, Detection of "Quorum sensing" molecules by CE and CE-MS. 7th International symposium and Summer School on Bioanalysis, 2007, Pécs, Hungary, P-3

Dergez T, König A, **Rezeli M**, Poór V, Kilár F, Detection of "Quorum sensing" molecules by GC-MS and CE-MS. 7th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2007, Siófok, Hungary, Book of Abstracts, pp. 92

Páger Cs, **Rezeli M**, Kilár F, Végvári Á, Capillary isoelectric focusing of dyes in uncoated capillary with UV and MS detections. 7th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2007, Siófok, Hungary, Book of Abstracts, pp. 151

Páger Cs, **Rezeli M**, Végvári Á, Kilár F, CIEF-MS analysis of different dye substances in uncoated capillary. 22nd International Symposium on MicroScale

Bioseparations & Methods for Systems Biology, 2008, Berlin, Germany, Abstracts Book, pp. 265