

# A kémiai szerkezet molekuláris felismerésre gyakorolt hatása

PhD értekezés tézisei

Takátsy Anikó

Kémiai Doktori Iskola

Bioanalitika Program

Témavezetők:

Prof. Kilar Ferenc  
Prof. Stellan Hjertén

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Bioanalitika Intézet

Pécs  
2008

## Bevezetés

### Molekuláris felismerés és szelektív gélek

A molekuláris felismerés felelős azon kötések kialakulásáért, amelyek lehetővé teszik (többek között) az enzimek és szubsztrátok, a gyógyszerek és célmolekulák (targetek), illetve a DNS két komplementer szála közötti kapcsolódást. A molekuláris felismerés akkor alakul ki két molekula között, ha azok mind geometriailag, mind elektrosztatikusan komplementerek, tökéletesen összeillenek (mint kulcs a zárral, Fisher, 1894) és nem-kovalens kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz. Ilyen nem-kovalens kötőerők a hidrogén-híd kötés, az elektromos- és hidrofób kölcsönhatások és a gyenge fém-koordinatív kötés. A molekuláris felismerés tanulmányozása központi helyet foglal el a szupramolekuláris kémiában és kiemelten fontos a gyógyszeriparban, a gyógyszertervezésben.

A molekuláris lenyomatkészítés definíciója a következő: Ligandum szelektív felismerésére alkalmas helyek kialakítása szintetikus polimerekben; templát (atom, ion, molekula, komplex vagy molekuláris, ionos makromolekuláris entitás, beleértve a mikroorganizmusokat is) jelenlétében történő kovalens kötések kialakító polimerizációs, illetve polikondenzációs folyamatok során. A szelektív felismerés a templát eltávolítása után, a templátok által kialakított formákban, helyeken történik. (Alexander, 2006).

Alapvetően két eljárás különböztethető meg a molekuláris lenyomat-készítési technikákban. Az egyikben, amely Wulff és munkatársai nevéhez kötődik, az összetevőket (egyensúlyi reakciókban kialakuló) kovalens kötések tartják az oldatban a polimerizáció előtt, a másikkban (Mosbach és munkatársai) egy előzetes elrendeződés alakul ki a lenyomatkészítő molekula és a funkcionális monomerek között nem-kovalens, illetve fém-koordinatív kötéseknek köszönhetően.

Az utóbbi években számos kísérlet igazolta, hogy a molekuláris lenyomatokat tartalmazó polimerek mesterségesen előállított kötőhelyül szolgálhatnak természetes antitesteknek, és felismerő komponensekként felhasználhatók, az 'immuno assay'-típusú analízisekben.

Hjertén és munkatársai 1996-ban dolgoztak ki egy új eljárást, amelynek segítségével fehérjék szelektív felismerése vált lehetővé. Emberi hemoglobinra, citokróm C-re, emberi transferrinre, növekedési hormonra, ribonukleázra és ló mioglobinra szelektív géleket készítettek nem-ionos monomerekből, ezáltal csökkentve a nem specifikus elektrosztatikus kölcsönhatásokat. A szelektivitást rokon fehérjékkel tesztelték (ló és bálna mioglobin). Készült, egyszerre egynél több fehérjére specifikus polimer is.

## Királis felismerés

A gyógyszerek körülbelül 40%-a királis vegyület. Ismert tény, hogy farmakológiai aktivitás az esetek nagy többségében csak az egyik enantiomerhez kapcsolódik (eutomer). Sok esetben nem kívánatos mellékhatás, sőt toxikus hatás is kötődhet a másik optikai izomerhez (disztomer), ezért szükséges és fontos az enantiomerek elkülönítése. Az optikai izomerek elválasztására szolgálnak a királis szelektorok. Ezek lehetnek nagy molekulájú, gyűrűs, szerves vegyületek (pl.: koronaéterek, ciklodextrinek) vagy antibiotikumok, de számos szénhidráttal és fehérjével (marha- és emberi szérum albumin, avidin,  $\alpha$ -glükoprotein, cellobiohidroláz, kazein, emberi szérum transzferrin) kialakított enantioszelektív kölcsönhatást is leírtak.

Az enantiomerekkel kialakított sztereoszelektív kölcsönhatások számos elválasztás-technikai (kromatográfias, elektroforetikus) eljárással vizsgálhatók. A kapilláris elektroforézis széles körben alkalmazott és igen hatékony elválasztási technika, mely kis anyagigénye mellett gyors analízist tesz lehetővé királis anyagok kölcsönhatásainak vizsgálatában is.

Munkám során két különböző molekuláris felismerési folyamatot tanulmányoztam. Királis komponensek elválasztását fehérje, mint királis szelektor alkalmazásával, illetve szelektív gélszemcsék használatának lehetőségét fehérjék, vírusok és baktériumok azonosítására.

## Célkitűzések

A molekuláris megismerés jobb megértésre irányuló kísérleteim céljai a következő pontokban foglalhatók össze:

A fehérjék sztereoszelektív felismerési folyamatai vizsgálatának fontos szerepe lehet mind a biológiai szerepük tanulmányozásában (pl. gyógyszerekkel való kölcsönhatás esetén), mind a fehérjék felületi kötőhelyeinek feltérképezése során.

1. A transferrin egyszerűen alkalmazható és hatékony királis elválasztóként felhasználható fehérje. Célul tűztük ki a ligandumként használt triptofán-észterekkel (metil-, etil-, butil-észter) kialakított kölcsönhatások tanulmányozásán keresztül, a molekuláris szerkezet (alkil-lánchossz) szerepének tisztázását a fehérje-ligandum kölcsönhatásban  
A másodlagos kölcsönhatások közül döntő szerepet játszhatnak az elektrosztatikus kölcsönhatások, illetve a hidrogénhidak. Célunk volt a fehérje-kismolekula kölcsönhatás pH függésének vizsgálata.
2. A fehérjék molekuláris szerkezetének a lenyomatképzési technikákban, a molekuláris felismerésre gyakorolt hatásainak vizsgálata különböző fehérjék esetén, pl.: humán és marha hemoglobin, illetve humán szérum transferrin.
3. A szelektív gélek specificitásának meghatározására elektroforézisen alapuló, általánosan alkalmazható módszer kifejlesztése.

Az eddig alkalmazott molekuláris lenyomat készítési technikák megoldást jelentettek kis molekulák szelektív felismerése esetén, de a vírusok és sejtek szelektív felismerése nem volt ilyen hatékony, egyszerű és olcsó eljárás

4. Vírus (*Semliki Forest Virus*) és baktérium (*Escherichia coli*) szelektív gélek kifejlesztése, és hatékonyságuk, illetve szelektivitásuk vizsgálata elektroforézissel.

## Módszerek

### Királis felismerés kapilláris elektroforézisben félálló fázisként használt humán szérum transzferrinnel

Az elektroforézis alapját a töltéssel rendelkező részecskék elektromos térben történő elmozdulása adja (Kohlrausch, 1897). Szabad oldatban végzett elektroforézis (Tiselius, 1937) esetén, a diffúzió rontja az elválasztás hatékonyságát, ennek kiküszöbölésére dolgozta ki Stellan Hjertén (1958) a kis keresztmetszetű forgó csőben végzett elektroforézis módszerét, mely a mai kapilláris elektroforézis elődje. Ez utóbbi eljárás széles körben elterjedt biomolekulák aminosavak, peptidek, fehérjék, nukleotidok és nukleinsavak elválasztására, és azonosítására. A kapilláris elektroforézissel sokféle detektálási technika kombinálható, ami szintén segíti a széleskörű felhasználást. Emellett a rendszer könnyen automatizálható és rendkívül egyszerű felépítésű.

A kapilláris elektroforézis kis minta mennyiségek gyors analizisét teszi lehetővé királis vegyületek kölcsönhatásainak vizsgálatokor is. Kis molekulák királis elválasztásának egyik lehetséges módja fehérjék alkalmazása királis elválasztóközegként (szelektorként). A fehérjék sztereoszelektív kötőhelyeivel az enantiomerek különböző erősségű kölcsönhatásokat alakíthatnak ki. A két optikai izomer így eltérő ideig áll kölcsönhatásban a fehérjével (minél erősebb a kölcsönhatás, annál tovább marad adott izomer kölcsönhatásban a felismerési hellyel), mely a racém elegy szétválasztását eredményezi.

Triptofán származékok (metil-, etil- és butilészter) királis elválasztásához humán szérum transzferrint használtunk királis szelektorként. A fehérje eltérő 'nyomással' (10-100 psi\*s) történő injektálása segítségével részlegesen töltött kapilláris állítható elő. A kísérleteket pH 6-on, a fehérje izoelektromos pontjának megfelelő pH értéken végeztük, így a különböző izoelektromos pontú transzferrin izoformák eredő, felületi töltése nulla vagy alig eltérő nullától, ezért a fehérjedugó nem (vagy alig) vándorol, így félálló fázisként alkalmazható. A triptofán származékok vándorlása így jól vizsgálható eltérő hosszúságú fehérjedugó (10 psi\*s injektálási nyomás mellett kb. 10mm hosszúságú zóna alakul ki) esetén.

Futtatások készültek pH 5 és pH 7 között, a transzferrin izoelektromos pontja körül, a pH triptofán származékok transzferrin segítségével történő királis elválasztását befolyásoló

hatásának feltérképezésére. Az izoelektromos ponthoz tartozó pH pontos értéke a transferrin szíálsav tartalmától, illetve a fehérje molekula vastelítettségétől függ.

### Szelektív gélek – “Antigének” molekuláris felismerése molekuláris lenyomatképzési eljárással készített polimerben

Az akrilamid fehérje, illetve vírus, mint templát jelenlétében történő polimerizációjával olyan specifikus szerkezet alakul ki, amely a fehérje vagy vírus eltávolítása után alkalmas a templát keverékekben történő specifikus felismerésére és azokból való kinyerésére.

A gél szerkezetét, pórusméretét a monomer és keresztkötő aránya, a katalizátor mennyisége és a pH szabályozza. A T<sub>6</sub>C<sub>5</sub> összetételű gél (teljes monomer koncentráció: 6%, a keresztkötő koncentrációja a teljes monomer koncentráció 5%-a) volt a számunkra legmegfelelőbb. A szintézis, a polimerképzéshez optimális 6,8-es pH értéken zajlott, 20mM koncentrációjú foszfát pufferben, melynek 980 µl térfogatában 57 mg akrilamid monomer és 3 mg N, N' metilén bisz akrilamid keresztkötő volt oldva.

A templátként használt makromolekula vagy vírus jelenlétében folytatott polimerizáció TEMED (tetrametil-etilén-diammin: 10µl, 5 (v/v) %), mint katalizátor és ammóniumperszulfát (10µl, 10 (m/V) %) hozzáadásával indítható, az összetevők gáztalanítása után, amire az oxigén, polimerizációt gátló hatása miatt van szükség. Tíz perc után már szemmel látható gélesedés tapasztalható, azonban a reakció teljes lejátszódásához az elegyet általában egész éjszakán át állni hagytuk.

Szelektív gélek készültek fehérjék (pl.: humán és marha hemoglobin, vasmentes és vassal telített transferrin), vírusok és vírusszerű képletek (Semliki Forest vírus vad típus és mutáns; BK-4) és sejtek: baktériumok (*Escherichia coli* és *Lactococcus lactis*), mint templát jelenlétében. Nem töltött gél szemcsék is készültek, templát nélküli polimerizáció során (*blank*), az esetleges nem specifikus kölcsönhatásokból származó vándorlás kiszűrésére.

A gélt fémhálók segítségével aprítottuk, majd a lenyomatkészítéshez használt templátot nátrium dodecilszulfát (50mM SDS, 50mM Tris-HCl pufferben, pH 8,5) segítségével távolítottuk el. Ezt követően az elektroforézis során háttéreelektroliként használt puffer (50mM Tris-HCl pufferben, pH 8,5) segítségével a detergenst is kimostuk a gélekből. A gél szemcsék tisztaságát a mosások után káliumklorid eluenshez adagolásával ( mely igen kis mennyiségben jelenlévő SDS-sel is jól látható, fehér csapadékot képez) és a szemcsék

elektroforetikus futtatásával teszteltük. A templát jelenlétében polimerizált, majd a fenti eljárással tisztított gélszemcsék *kontroll*ként szolgáltak a kísérletekben.

A poliakrilamid töltéssel nem rendelkező polimer, ezért a gélszemcsék csak a töltött részecskékkel (fehérje, vírus) való kölcsönhatás révén mozdulnak el. Az elmozdulásból következtethetünk arra, hogy kialakult-e kölcsönhatás a gél és az adott szubsztráttal között.

Kétféle kísérleti elrendezést használtunk, a szelektív gélek és a templát közötti kölcsönhatások kialakítására, az egyensúly beállítására:

Az **I** eljárás során, a kvarccső templátot tartalmazó háttér elektrolittal volt töltve, ebbe két, három zónában; 5-10 gélszemcsét tartalmazó szuszpenzió került beinjektálásra. A templátot tartalmazó háttélektrolitban történő futtatás során, az templát jelenlétében polimerizált gélszemcsék kölcsönhatásba lépnek a töltött templát részecskékkel, és az ellenkező polaritású elektród irányába vándorolnak, míg a nem szelektív szemcsék nem mozdulnak.

A **II.** lehetőség hogy a polimerizációkor kialakult, majd kimosott üregeket telítjük a futtatás előtt, és az elektroforézist puffer oldatban végezzük. Ilyen eljárás során adott templátra szelektív és blank gélszemcsék mosás után templát oldatba kerülnek, majd egy 30 perces szobahőmérsékleten, rázatás közben végzett inkubáció után, többszöri futtató pufferben (50mM Tris-HCl puffer, pH 8,5) történt mosás után vizsgáljuk vándorlásukat..

A szelektív gélek és fehérjék (illetve vírusok) 'reakcióját' (szelektív kölcsönhatását), a gél granulálása után, kvarccsőves elektroforézis készülékkel vizsgáltuk. Egy 1958-ban készült készüléket használtunk, mivel az aprítás utáni szemcsék is túl nagyok ahhoz, hogy kapillárisban vizsgáljuk őket. Ez a műszer, egy 245 mm hosszú, 2,5 mm belső átmérőjű és 9,6 mm külső átmérőjű, hossz tengelye körül forgó, az adszorpció és az elektroendozmotikus áramlás minimalizálására kovalensen kötött poliakrilamiddal fedett kvarc csövet tartalmaz. A hagyományos gélelektroforézis kamrájához hasonlóan, a cső két vége két elektrolit tartállyal áll összeköttetésben. A tartályokba egy-egy elektród merül, amelyek egy tápegységhez kapcsolódnak. A forgó kvarccső puffer oldattal van feltöltve, ami biztosítja az áramkör zárását. A kísérletek szobahőmérsékleten készültek, 500V feszültség és 50  $\mu$ A áramerősség mellett.

20-25  $\mu$ l mesterséges antitestet tartalmazó szuszpenzió (5-10 szelektív gélszemcse) injektálása után a részecskék elektroforetikus vándorlása a forgó csőben szemmel követhető. A vándorlási adatokból mobilitás számolható, melyet Tiselius egységben adtunk meg ( $10^{-5}$   $\text{cm}^2/\text{Vs}$ ).

## Eredmények

A kémiai szerkezet molekuláris felismerésre gyakorolt hatásának vizsgálata transzferrin estében

Eltérő alkilánc hosszúságú triptofán származékok (metil-, etil-, butilészter) királis elválasztása került kivitelezésre humán szérum transzferrin, mint félálló királis elválasztó fázis jelenlétében. Minden kísérletben a triptofán butilészter enantiomerjeinek felbontása adódott a legnagyobbnak, a metilészteré a legkisebbnek, míg az etilészter közbülső értéket mutatott. A kapilláris csak részben volt feltöltve a szelektorként alkalmazott fehérjével, ezért a mobilitások két részből számolhatók: vándorlás a fehérje dugóban és vándorlás szabad oldatban, a fehérjén kívül. Különböző zónahosszok jelenlétében történtek vizsgálatok, de a számítások a transzferrin zónán belüli mobilitásra azonos értékeket adtak. A megállapítást, hogy a kémiai szerkezet befolyásolja a királis felismerést a fehérjékkel való kölcsönhatások során, alátámasztja, hogy a 'hosszabb' alkiláncot tartalmazó származékok (butil- és etil észter) hasonló vándorlási viselkedést mutatnak, ami eltérő a metil észter viselkedésétől. Az utóbbi sztereoselektív felismeréséhez nagyobb ionerősség és nagyobb transzferrin koncentráció szükséges.

Megállapítható, hogy az eltérő felépítésű vegyületek királis felismeréseinek összehasonlításához azonos kísérleti körülményekre van szükség. Ahol például az egyes vegyületek vándorlási sebesség eltérő, ott a kölcsönhatások vizsgálatakor, jellemzésekor azok ideje azonos kell, hogy legyen.

Általános lenyomatkészítési eljárás mesterséges gél antitestek előállítására - egyedülálló, fehérjék, vírusok és sejtek (baktériumok) igen kis szerkezeti különbségeit észlelhetővé tevő elektroforézis technikával kapcsolva

Szelektív gélek (más néven mesterséges antitestek) állíthatók elő és alkalmazhatók molekuláris felismerési folyamatokban. A gélek akrilamidból és a keresztkötőként alkalmazott N, N' metilén bisz akrilamidból készíthetők különböző templát részecskék ('antigének') jelenlétében, amik lehetnek fehérjék (pl.: humán és marha hemoglobin, vassal



telített és vasmentes transzferrin), vírusok (Semliki Forest vírus, vad típus és mutáns, BK-4 vírusszerű képlet) és baktériumok (Escherichia coli és Lactococcus lactis).

A poliakrilamid gél semleges, ezért a gélszemcsék nem vándorolnak elektromos erőterben-ez a tulajdonságuk esetünkben kiaknázható volt a mesterséges gél antitestek szelektivitásának igazolására. A szelektív gél, ugyanis csak a polimerizációjakor jelenlévő templáttal való mesterséges antitest/antigén (templát) komplex kialakulásakor, az antigén töltöttsége esetén (pl. fehérjék esetén izoelektromos ponttól eltérő pH) lesz töltött. Ha az antigént teljesen eltávolítjuk a gélből, újra semleges (töltés nélküli) lesz a mesterséges antitest, így a templát szelektív felismerése jól tanulmányozható a mesterséges antitestként működő gélszemcsék elektroforézise során.

A szelektivitás mértékére jellemző, hogy ló mioglobinnal specifikus mesterséges antitest szemcsékkel töltött oszlopról eluált minta ioncserés kromatográfiás vizsgálata során, a ló mioglobin megkötődött az oszlopon, míg a bánya mioglobin nem, annak ellenére, hogy a két fehérje szerkezete nagyon hasonló.

Munkám során egy egyszerű, olcsó, könnyen kezelhető elektroforézisen alapuló eljárást, fejlesztettem ki, mely a kísérleti eredmények alapján kitűnően alkalmas fehérjék és molekuláris lenyomat-készítési technikával előállított mesterséges gél antitestek kölcsönhatásának vizsgálatára. Templátként szolgált többek között a humán szérumban transzferrin, melynek vassal telített és telítetlen formája közötti a gél antitest/fehérje komplex mobilitásában tapasztalható nagy különbséget, az igen kis 3 dimenziós szerkezeti eltérés (azonos aminosav sorrend mellett) okozza.

Ugyan ez a megfigyelési eljárás teszi követhetővé nagyobb bioentitások, mint vírusok és baktériumok szelektív lenyomatát tartalmazó gél antitestek és templátjaik kölcsönhatását.

A mesterséges gél antitestek szintézisének és a gél antitest/antigén komplex elektroforézises vizsgálatának egyszerűsége ellenére egyedülálló együttese szélsőségesen kicsi eltérések észlelését teszi lehetővé a kémiai felépítésben, illetve a konformációban, nem csak molekulák, hanem nagyobb részecskék esetén is.

A humán és marha hemoglobinnal szelektív gélekkel végzett kísérletek, a gélek nagyfokú specificitására, szelektivitására mutatnak rá. A humán hemoglobinnal szelektív gél nem vándorolt a marha hemoglobinnal tartalmazó puffer oldatban történő elektroforézis során, bár a két fehérje 3 dimenziós szerkezete és aminosav szekvenciája nagyon hasonló. (Kísérlet kivitelezése az *I. eljárás* alapján történt.)

Az üres szelektív gélszemcsék és az antigén molekulák között gyorsan kialakulnak az erős kölcsönhatások, hisz a gélszemcsé/fehérje komplexek azonnal vándorolni kezdenek az

áramkör zárása, feszültség rákapcsolása után, és minden vándorlási idő-távolság diagramon szereplő pontra egyenes fektethető, ami a kialakult kölcsönhatások erősségét (számának állandóságát) mutatja. Ezek alapján megállapítható, hogy a hemoglobin molekulák nem hagyják el az antitest szemcséket a futtatás során, más szóval a kölcsönhatások kialakulása irreverzibilis 'átlagos' kísérleti körülmények között (szobahőmérséklet, standardnyomás). Ennek ellenére felmerül a kérdés, hogy egyes kölcsönhatási helyek kinetikája lassú, mivel a fehérjével telített gélszemcsék (értsd: templát oldatban inkubált, ld. **II. eljárás**) mobilitása a templátmentes pufferben valamivel kisebb volt a fehérjét tartalmazó oldatban kivitelezett elektroforézis során tapasztaltnál (**eljárás I**). Itt kell megjegyezni, hogy a gél aprítása inhomogenitást eredményez a gélszemcsék alakjában, felületének nagyságában.

A mesterséges antitestek stabilitását jellemzi, hogy humán hemoglobinra szelektív fagyasztva szárított gélszemcsék visszanyerték szelektivitásukat rehidratálás után. Az eltérő időpontokban készített gélek szelektivitása hasonló, a mérések reprodukálhatósága kielégítő. A nagy reprodukálhatóságot jellemzi, hogy kis antigének közötti eltérés is gyorsan, szignifikánsan detektálható. Humán szérum albuminnal nem adott reakciót egyik hemoglobinra szelektív gél sem, alátámasztva ezzel a nem specifikus kölcsönhatások hiányát. Az egyik ok a keresztkötött poliakrilamid mint lehetséges polimer kiválasztására, a gél nagy biokompatibilitása volt (értsd: a fehérjékkel adott nem specifikus kölcsönhatások száma elhanyagolható, mely jól látható az SDS-PAGE keskeny, szimmetrikus zónáinak esetén).

A szintetikus antitesteknek sok előnye van a fehérje antitestekkel szemben: egyszerűbb előállíthatóság, nagyobb stabilitás, mellőzhetővé teszik a kísérleti állatok használatát az előállítás során és nagy szelektivitásuk, melyet az antigénnel való nagyobb felületen történő kapcsolódás eredményez. A nagy szelektivitás mellett számos olyan alkalmazási terület van, ahol a mesterséges antitestek készítése az egyetlen megoldás, hiszen vírus illetve baktérium elleni fehérje antitestek nem állíthatók elő kísérleti állatokban. Ezzel ellentétben mesterséges antitestek igen nagy szelektivitással szintetizálhatók bioentitásokra.

Semliki Forest vírusra (SFV) szelektív mesterséges gél antitest készült, mely kölcsönhatást alakított ki a vírussal (vad típus), de nem mutatott reakciót a BK-4 vírusszerű részecskével. A vírussal kialakuló kölcsönhatások létrejötte időfüggetlen, ezt bizonyítja, hogy a **II.** eljárás során kialakított telített gél/vírus komplexek mobilitása nagyobb, mint az elektroforetikus futtatás során kialakulóké.

A mesterséges antitestek szélsőségesen nagyszелеktivitásának kitűnő példája, hogy a Semliki Forest vírus (SFV) vad típusára szelektív mesterséges gél bár kölcsönhatásokat alakít ki a mutáns vírussal is, de sokkal kisebb mértékben, mint a vad típussal, annak ellenére, hogy a

vad és mutáns vírus csupán három aminosav eltérést mutat a kapszidot felépítő három fehérje egyikében!

A nettó töltéssűrűség a gél antitesten nem változik a kísérletek során, ami a vírus szoros kötődését mutatja. Ez egy nagyon fontos eredmény, hiszen ez azt jelenti, hogy vírusokat tudunk kidúsítani például szélsőségesen híg szuszpenziókból, ami lehetővé tesz számos alkalmazást (pl. vér gyors analízisét HIV-ra, West Nile Fever-re és Hepatitisre egy esetleges transzfúzió előtt).

A fent leírt széles körben alkalmazható módszer segítségével lehetővé válik szelektív gél antitest készítése baktériumok ellen is. A gél szelektivitása ebben az esetben vizsgálható a már fent leírt elektroforetikus módszer mellett mikroszkópos technikával is. Ezt az eljárást *Escherichia coli* szelektív gél és blank gél összehasonlítása során alkalmaztam.

*E. coli* MRE-600 jelenlétében és készült szelektív gél, itt azonban a szokásos detergenses mosás mellé egy lizozim enzimet tartalmazó mosó lépést is be kellett iktatni, hogy a baktériumok eltávolítása megtörténjen. A bakteriális méret túl nagynak bizonyult a gélből való ki és belépése, így a mikroszkópos felvételekhez készített vékony rétegnek csak a felületéről lehetett eltávolítani, majd visszakötni az templátot, melyet sötét foltok megjelenése jelzett a mikroszkópos felvételen.

A fent leírt mesterséges gél antitest készítési és a detektálást lehetővé tevő elektroforetikus technika kombinációjával, nemcsak igen kis, akár csak konformációs különbségek írhatók le, hanem nagyobb entitások szerkezete közötti kis különbség is kimutatható.

Az általánosnak mondható szélsőségesen nagy szelektivitás három különböző okból eredhet: (a) az antigént a mesterséges antitest (a fehérje antitesttel ellentétben) körbeöleli minden oldalról. Ez a teljes felületen történő érintkezés jóval nagyobb szelektivitást is eredményezhet, mint a pusztán kis felületen kapcsolódó fehérje antitestek esetén, (b) a sokféle lehetséges kölcsönhatási típus, mely kialakulhat az antigén és a lenyomatot tartalmazó gél között, (c) a gél antitest/antigén komplex töltése (zéta potenciál).

## Következtetések és lehetőségek

A 'hosszabb' alkiláncot tartalmazó triptofánszármazékok (butil- és etil észter) hasonló vándorlási viselkedése, és ezek eltérése a metil észter viselkedésétől (mely a sztereoszelektív felismerési folyamatok eltérőségéből adódik) által igazolást nyert, hogy a kémiai szerkezet befolyásolja a királis felismerést a fehérjékkel való kölcsönhatások során. Nagyobb transzferrin koncentráció és ionerősség, éppúgy ahogy a fehérjében eltöltött hosszabb idő szükséges a triptofán metilészter enantiomerjeinek szétválasztásához. További vizsgálatok szükségesek a szerkezet fehérjék általi molekuláris felismerési folyamatokban betöltött pontos szerepének tisztázásához.

A molekuláris felismerés jobb megértésére egy speciális, nagyméretű biomolekulák felismerésére is alkalmas lenyomat-készítési eljárást használtam. A humán szérumban transzferrint (más fehérjék között) templátként alkalmaztam a lenyomatot tartalmazó poliakrilamid szelektív gélek készítése során. Egy egyszerű, olcsó és könnyen kezelhető elektroforézisen alapuló eljárást fejlesztettünk ki a templátként szereplő fehérje és az arra szelektív gél kölcsönhatásainak tanulmányozásához. A fehérje vassal telített és vasmentes formáinak megegyező aminosav szekvencia mellett, a pusztán 3 dimenziós szerkezetben való kis konformációs eltérései igen nagy különbségeket eredményeztek a gél antitest/fehérje komplexek vándorlási sebességében annak ellenére, hogy a szabad oldatban történő elektroforézis során csak igen kis különbségek tapasztalhatók.

Ugyanez a technika alkalmazható biorészecskék (pl. vírusok és baktériumok) jelenlétében polimerizált gél antitestek vizsgálatára. A szelektív gélek előállításának és a gél antitest/antigén komplex ezen típusú elektroforézises vizsgálatának kombinációja egyedülálló, hiszen egyszerűsége ellenére a kémiai szerkezetben és konformációban lévő szélsőségesen kicsi eltérések megkülönböztetésére alkalmas, nem csak fehérjék, hanem vírusok és baktériumok esetén is.

Ez a technika igen egyszerű lehetőséget nyújt vírusok és baktériumok összetett keverékekből (mint pl. humán vér vagy vizelet) történő azonosítására, akár kit formában is.

A templát részecskék a szelektív felismerés és a lenyomatot tartalmazó gél üregekbe történő szelektív kötődés után megfesthetők Coomassie Brilliant Blue illetve fluoreszcens festékekkel.

Spektrofotometriás mérések segítségével is követhetők a szelektív gélszemcsék és a templát között kialakuló kötési folyamatok. A templátot tartalmazó oldatban szobahőmérsékleten,

rázás mellett inkubálva szelektív antitesteket, a templátoldat abszorbanáciája eltérő értéket ad gél antitest / antigén kötődés kialakulása esetén. Ezen kísérletekhez nagyobb kapacitással rendelkező szelektív gélek kialakítására van szükségünk.

## A PhD értekezés alapját képező közlemények jegyzéke

- Takátsy, A.**, Hodrea, J., Majdik, C., Irimie, F. D., Kilár, F., Role of chemical structure in molecular recognition by transferrin. *J.Mol.Recognit.* **19** (2006) 270-274. IF: 3,712 (2005)
- 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). *J.Sep.Sci.* **29** (2006) 2802-2809. IF: 2,535 (2006)
- Takátsy, A.**, Sedzik, J., 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) II. Gel Antibodies against virus (Semliki Forest Virus). *J.Sep.Sci.* **29** (2006) 2810-2815. IF: 2,535 (2006)
- Bacskay, I., **Takátsy, A.**, Végvári Á., Elfving, A., Ballagi-Pordány 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) III. Gel Antibodies against Cells (Bacteria). *Electrophoresis* **27** (2006) 4682-4687. IF: 4,101 (2006)
- Takátsy, A.**, Végvári, Á., Hjertén, S., Kilár, F., 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). Ib. Gel Antibodies against Proteins (Hemoglobins) *Electrophoresis* **28** (2007) 2345-2350, IF: 4,101 (2006)  
DOI: 10.1002/elps.200600191

## Folyóiratban megjelent összefoglalók:

- Kilár, F., Visegrády, B., **Takátsy, A.**, Kuti, P., Sagi, C., Chindea, V., Mapping of stereoselective binding sites on proteins by capillary electrophoresis and molecular modeling. *FEBS Journal* **272** (2005) 377-377.
- Hjertén, S., Ghasemzadeh, N., Hjertén, M.-C., Végvári, Á., Bacskay, I., Kilár, A., Rezeli, M., **Takátsy, A.**, Kilár, F., Ballagi, A., Elfving, A., Cheng, H., Sedzik, J., Astrup, 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.

Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények jegyzéke:

Hideg, É., **Takátsy, A.**, Sár, C. P. Vass, I., Hideg, K., Utilizing new adamantyl spin traps in studying UV-B-induced damage of photosystem II. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **48** (1999) 174-179. IF:1.597 (2005)

Présing, M., Herodek, S., Vörös, L., **Takátsy, A.**, Kovács, Gy., Az algák nitrogénfelvétele és a Balaton nitrogénterhelése. *Hidrológiai Közlöny* **80** (2000) 342-344.

**Takátsy, A.**, Csóka, B., Nagy, L., Nagy, G., Periodically interrupted amperometry at membrane coated electrodes: A simplified pulsed amperometry, *Talanta* **69** (2006) 281-285. IF: 2,81 (2006)

Présing, M., Preston, T., **Takátsy, A.**, Spróber, P., Kovács, A. W., Vörös, L., Kenesi, Gy., Kóbor I., Phytoplankton nitrogen demand and the significance of internal and external nitrogen sources in a large shallow lake (Lake Balaton, Hungary) (2007) online IF: 1,049 (2007)

Montskó, G., Boros, B., **Takátsy, A.**, Ohmacht, R., Glasl, S., Krenn, L., Mark, L., Reznicek, G., Separation of Sesquiterpenes from Yarrow (*Achillea millefolium* L. S. I.) by LC-MS on Non-Porous Columns, *Chromatographia* (2008) on-line IF: 1,171 (2007)

Háda M., Nagy V., **Takátsy A.**, Deli, J., Agócs, A., Towards carotenoid dendrimers: dimers of carotenoids, *Tetrahedron letters* submitted.