

Nemenzimatikus glikáció vizsgálata új bioanalitikai módszerekkel

Doktori értekezés

Böddi Katalin

Gyógyszertudományi Doktori Iskola

Témavezető: Prof. Dr. Ohmacht Róbert

Társ-témavezető: Dr. Szabó Zoltán

Programvezető: Prof. Dr. Deli József

Doktori Iskola vezető: Prof. Dr. Barthó Lóránd

Pécsi Egyetem

Általános Orvostudományi Kar

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Pécs

2011.

Rövidítések

AC	Amadori termék	HSA	humán szérum albumin
ACN	acetonitril	MALDI	mátrix segített lézer deszorpciós ionizáció
AGE	előrehaladott glikációs végtermék	MALDI-TOF/MS	mátrix segített lézer deszorpciós ionizáció-repülési idő/tömegspektrometria
FL	fruktozil lizin	MS	tömegspektrometria
FL-18	fruktozil lizin 1 víz molekula vesztes után	SPE	szilárd fázisú extrakció
HbA1c	hemoglobin A1c	TFA	trifluorecetsav
HPLC	nagyhatékonyságú folyadék kromatográfia	TOF	repülési idő

Bevezetés

Nemenzimatis glikáció

A nemenzimatis glikáció a poszttranszlációs módosulások egyik típusa, melyek a fehérje szerkezetében az m-RNS-ről történő transzláció után mennek végbe. A folyamat során redukáló cukrok (glükóz, fruktóz, ribóz stb.) kovalens kötással kapcsolódnak a fehérjék primer aminocsoportjaihoz, többek között a fehérje lizin oldalláncainak ϵ -aminocsoportjához. A kezdeti termék egy Schiff bázis intermedier, mely izomerizációs folyamatok során Amadori termékekké (AC) alakul. Az Amadori termékek további oxidációs és átrendeződési folyamatokban vehetnek részt, esetenként hidrolízisen, kondenzáción, fragmentáción, oxidáción és gyűrűvé záródási reakción (ciklizáció), melyek eredményeképp egy biológiailag jelentősen reaktívabb vegyületek jönnek létre. Ezt a vegyület csoportot előrehaladott glikációs végtermékeknek nevezzük (AGE). A Schiff bázis keletkezése relatív gyors és nagymértékben reverzibilis folyamat. A Schiff bázisból keletkező Amadori termékek keletkezése viszont lassabb, de meglehetősen gyorsabb, mint az AGE termékek bomlása, ennek következtében a glikációs termékek akkumulálódhatnak a fehérjéken.

A nemenzimatis glikáció eredményeképp AGE termékek jönnek létre a megemelkedett vércukorszint miatt hiperglikémia esetén diabétesz mellitus I és II-ben szenvedő betegekben.

Klinikumban alkalmazott módszerek a nemenzimatis glikáció meghatározására

Az 1970-es évek óta a glikált hemoglobin A1c (HbA1c) meghatározását klinikai diagnosztikai markerként rutinszerűen alkalmazzák a relatíve hosszútávú (4-6 hét) glükóz szint meghatározására diabéteszben szenvedő betegeknél.

A szérumban glikált albumin szintjéről úgy gondolják, hogy az elmúlt 2-4 hét vércukor állapotáról ad információt, míg a HbA1c az elmúlt 1-3 hónapra enged következtetni. A glikált humán szérumban albumin (HSA) egy nagyon fontos középtávú indikátora a diabétésznek, mely sokkal érzékenyebb a vércukorszint változására, mint a HbA1c.

Fehérjék és peptidok sómentesítése szilárd fázisú extrakcióval (SPE)

A szilárd fázisú extrakció könnyen kivitelezhető módszer, melyet leggyakrabban sómentesítésre, tisztításra, minta koncentrációjának növelésére és komplex peptid keverékek frakcionálására alkalmaznak. A nagyobb fehérjék enzimatisz emésztésével nyert peptidkeverékek analízise előtti frakcionálás hatékonyan növeli az elérhető fehérje szekvenciafedettséget. Az SPE módszer további előnye, hogy magas visszanyerés érhető el, rövid idő alatt kivitelezhető, nagy a dúsítási hatékonyság és alacsony a szerves oldószerigény.

Az egyik leggyakoribb SPE alkalmazási terület a peptidok és a DNS oligonukleotidok sómentesítése. Az eljárás során ezek a mintamolekulák megkötődnek a szilárdfázison, a nemillékony sók viszont desztillált vízzel eltávolíthatók.

Mikroextrakciós módszerek:

Az elmúlt években az SPE eljárás fejlesztés a miniatürizálás irányába mutat. A miniatürizált SPE pipettahegyek 0,1mg fordított fázisú töltetet vagy más szorbenst tartalmaznak, melyek lehetővé teszik, hogy a kívánt komponensek kistérfogató mozgófázisban nyerhetők vissza a szorbensről. A miniatürizált SPE-t a MALDI-TOF/MS analízis előtti mintaelőkészítéshez fejlesztették ki.

Boronát affinitás kromatográfia

Boronát affinitás oszlopokat 1970-ben Weith és munkatársai alkalmaztak először cukrok, poliszacharidok és nukleinsav komponensek elválasztására. Majd Mallia és munkacsoportja 1981-ben proteomikai alkalmazását is publikálta, melyben glikohemoglobin minőségi és mennyiségi meghatározását végezték.

A bórsav és a boronsav polialkoholokkal és cisz-diol csoportot tartalmazó szénhidrátokkal stabil észtert képeznek. Mostanra ezt a módszert alkalmazzák a cisz-diolt tartalmazó komponensek elválasztására, többek között szénhidrátok, enzimek, glikált fehérjék, glikált peptidok.

Boronát affinitás kromatográfiát hatékony elválasztás technikai módszernek tartják glikált hemoglobin meghatározására, hemoglobin glikációs mintázatának megállapítására diabétesz esetén, arginin tartalmú peptidek tisztítására, glikoproteinek és glikopeptidek elválasztására.

A diabétesz mellitusz igen elterjedt betegség, a Föld lakosságának 4%-át érinti. Emiatt nagy erőfeszítéseket tesznek, hogy a betegség akut panaszait kontrolálják (hipoglikémiás kóma, ketoacidózis és fertőzések), illetve a betegség hosszútávú szövődményeit úgy, mint makroangiopátia, vaszkulopátia, immundeficiencia, nefropátia, retinopátia and neuropátia, melyek még mindig elterjedtek.

Célkitűzés

Szilárd fázisú extrakció alkalmazásának fejlesztése:

- I. C30 és C60(30) fullerén-szilika kötőkapacitásának megállapítása Leu-enkefalin segítségével*
- II. Triptikus emésztmények szekvenciafedettségének megállapítása C18, C30 szilika- és C60(10), C60(30), C60(100) fullerén-szilika fázisokon*
- III. Humán szérum albumin (HSA) és fibrinogén glikációs helyeinek meghatározása C30 és C60(30)-fázisokon*

Glikált peptidek elválasztása boronát affinitás kromatográfiával:

- IV. Különböző elúciós körülmények optimalizálása boronát affinitás pipetta hegyeken.*
- V. Glikált peptidek sótlanítása különböző szorbenseken*
- VI. Az újonnan fejlesztett módszer alkalmazása glikált peptidek meghatározására humán szérum albumin emésztményből, melyet kettestípusú diabéteszben szenvedő betegek és egészséges önkéntesek véréből gyűjtöttünk*

Anyag és módszer

Humán szérum albumin (HSA) és fibrinogén *in-vitro* glikációja

Öt mg humán szérum albumint (Sigma-Aldrich) foszfát pufferben (pH 7,4) oldott 0,167 M-os D-glükóz oldatba oldottuk fel. A fibrinogén (Sigma-Aldrich) nem oldódik vízben, így 2 mg fehérjét rétegeztünk 37°C-os 0.9% m/v-os sóoldat tetejére, mely 0,167 M-os volt glükózra nézve. Mindkét fehérjeoldatot 28 napig, 37 °C-on, steril körülmények között tartottuk. A további módosítások és triptikus emésztés előtt a glikált HSA-t és glikált fibrinogént egy membrán segítségével centrifugálással (Millipore, cut-off: 3000 Da) tisztítottuk.

C30 és C60(30)-szilika fázisok peptidmegkötése

Az aktiválás és ekvibrálás után 3-3mg C30-szilika és C60(30) fullerén-szilika fázist egy éjszakán át inkubáltunk Leu-enkefalin változó koncentrációjú (60-210 µg/mL) oldatokban 20°C-on, állandó rázatás közben. Ezután a részecskéket lecentrifugáltuk és a felülúszókat vizsgáltuk.

Fehérjeemésztmények szilárd fázisú extrakciója (SPE)

Húsz pmol glikált HSA és 20 pmol fibrinogén tripszinnel történő emésztése után az emésztményt 200 µL 0.1% TFA vizes oldatban az ekvibrált szorbensekre töltöttük. Az SPE csöveket 3-szor 1 mL 0.1% TFA vizes oldattal mostuk, hogy a nemkötődött peptideket eltávolítsuk. A szorbenseken kötődött peptideket 5%-tól 70%-ig 5%-os emelkedő acetonitrilt (0.1% TFA) tartalmazó oldatsorozattal frakcionáltuk. Minden elúciós lépésnél 300 µl oldatot alkalmaztunk. A frakciókat összegyűjtöttük, bepároltuk, majd 5 µl bidesztillált vízbe visszaoldottuk és MALDI-TOF tömegspektrométerrel analizáltuk.

Boronát affinitás kromatográfiához alkalmazott kötőpuffer és az elúciós körülmények optimalizálása amperometriás mérésekkel

A kísérlet első felében 250mM koncentrációjú ammónium klorid oldatokat készítettünk, pH-jukat ammónia oldattal állítottuk be 7,4; 7,8; 8,2; 8,6; 9,0 és 9,4-re. Minden oldat 50 mM magnézium szulfátot tartalmazott. A rehidratálás után a boronát affinitás pipetta hegyeket ekvibráltuk a korábban említett kötőpufferrel. 0,01 mol D-glükózt oldottunk fel 10 ml kötőpufferben és az oldatot a gélen keresztül szívattunk. Ezt követte egy mosási lépés kötőpufferrel a nem kötődött glükóz eltávolítására. Végül a megkötött D-glükózt 200 µl 2-es pH-jú hangyasav oldattal nyertük vissza.

A kísérlet második részében a pH-t állandó értéken tartottuk és az ammónium klorid koncentrációját 50 és 300 mM között változtattuk. Majd 0,01 mol D-glükózt oldottunk fel és aspiráltuk a pipettahegy géldarabkáin keresztül. A megkötődött glükózt 200 µl 2-es pH-jú hangyasav oldattal eluáltuk.

A fenti kísérletek alapján azt az összetételű kötőpuffert választottuk, mellyel a legnagyobb glükóz-kötőkapacitást érték el és az elúciót pH 2 és 5 között vizsgáltuk. További kísérleteket végeztünk az elúciós körülmények optimalizálására magas koncentrációjú (0,1-1,6 M) szorbitol oldattal D-glükóz boronát affinitás pipettahegyről történő eltávolítására.

Kettestípusú diabéteszben szenvedő betegek és egészséges önkéntesek véréből HSA izolálása és tisztítása

Kettestípusú diabéteszben szenvedő betegektől és egészséges önkéntesektől szérumot gyűjtöttünk, majd 2 ml szérumot Centricon Ultracel YM-50 típusú membránszűrőn (Millipore) centrifugáltuk 5000×g fordulaton 20 percig (cutoff: 50000Da). A membránon maradt proteinek 20-szorosára hígítottuk és a HSA-t kovasil MS-C18 nemporozus oszlopon (Zeochem AG, Uetikon) nagyhatékonyságú folyadék kromatográfiás berendezés (HPLC) segítségével elválasztottuk.

A HPLC készülék egy Dionex P680-as típusú gradiens pumpából, egy Reodyne 8125-ös injektorból és egy Dionex UVD 340U UV-Vis (UV-láthatófény) detektorból állt. Az adatrögzítést Chromeleon szoftver segítségével végeztük.

Glikált peptidek szelektív dúsítása boronát affinitás pipettahegyek segítségével

200 µl teljes térfogatú pipettahegyeket alkalmaztunk, melyek 5 µl-es agaróz géldarabkáján immobilizált m-aminofenil bórsavat tartalmaztak (PhyTip 1000+ columns, PhyNexus)). Ezeket az affinitás hegyeket használtuk a glikált peptidek szelektív dúsítására. Rehidratálás után a pipettahegyeket kötőpufferrel ekvibráltuk. Minden fehérjéből (glikált HSA, glikált fibrinogén) 100 µg-ot tripszinnel megemésztettük, majd kötőpufferben feloldottuk és az így nyert oldatot a pipettahegyben levő affinitás gélen aspiráltuk. A géldarabkákat 1 ml kötőpufferrel mostuk a nemspecifikusan kötődött peptidek eltávolítására. Ezt követte egy további mosási lépés (bidesztillált víz) a kötőpuffer sótartalmának eltávolítására, ha az elúciót hangyasavval végeztük. A glikált peptidek gélről való eltávolítását 4x 50 µl hangyasav oldattal (pH=2) végeztük. A glikált peptidek gélről történő eltávolítását nagyobb koncentrációjú szorbitol oldattal is elvégeztük. Szorbitollal történő elúció esetén MALDI tömegspektrometriás vizsgálat előtt a peptideket különböző szorbenseken sótlanítottuk (ZipTip, C18-szilika és C60(30) fullerén-szilika).

Az affinitás hegyekről szorbitollal eluált glikált peptidek sómentesítése

A boronát affinitás pipettahegyekről eluált peptidek sómentesítésére 3 különböző szilárdfázisú extrakciós szorbenst hasonlítottunk össze. 5 mg fullerénnel módosított 30nm pórusátmérőjű szilikát (C60(30) fullerén-szilika) és 5 mg C18 szilikát töltöttünk 1,5 ml-es SPE csövekbe. Aktiválás és ekvibrálás után a szorbenseken megkötött glikált peptidek eltávolítása 300 µl 80% acetonitril, 0,1% TFA vizes oldattal történt. Az eluátumot bepároltuk és 5 µl 0,1% TFA vizes oldatba oldottuk vissza. A sótlanítást a kereskedelmi forgalomban is kapható ZipTip-pel (Millipore) is elvégeztük, ebben az esetben 1 µl 80% ACN és 0,1% TFA vizes oldattal eluáltunk közvetlenül a MALDI mintatartóra.

MALDI-TOF tömegspekrometriás vizsgálat

Autoflex II MALDI MS (Bruker Daltonix) készüléket alkalmaztunk a tömegspekrometriás mérésekre. Minden tömegspektrumot pozitív módban pulzáló ionizációval ($k=337\text{nm}$, nitrogén lézerrel, maximális frekvencia 50 Hz, maximális lézerintenzitás 20-30% peptidek mérésekor) vettünk fel. A tripszines emésztéssel nyert peptidek tömegét reflektrom módban 120 ns-os késleltetett extrakcióval, monoizotópos felbontással mértük.

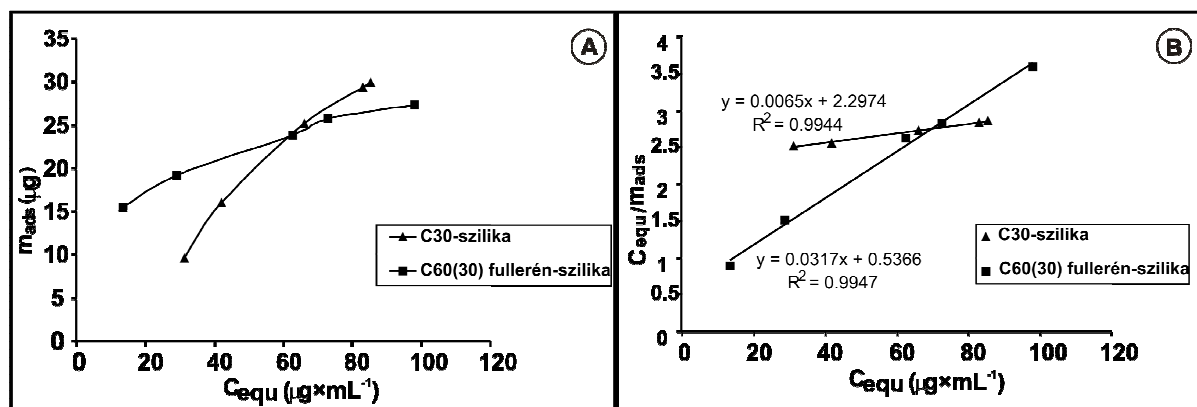
A fehérjék mérése lineáris módban 550 ns-os késleltetett extrakcióval történt. A gyorsítófeszültséget +19 V-ra, a reflektromfeszültséget +20 V-ra állítottuk. A peptidek és fehérjék tömegspektruma 1000 lövés összegéből (ugyanazon mintapontból) külső kalibrációval készült. Az eredmények kiértékelésére Flex Analysis szoftvercsomagot (Bruker Daltonix), az *in-silico* emésztésekhez a Sequence Editor szoftvert (Bruker Daltonix) használtuk.

Eredmények és megvitatásuk

A szilárd fázisú extrakciós kísérletek eredményei

A szorbensek összehasonlítása

A C30 és C60(30) fázisok adszorpciós tulajdonságainak meghatározására különböző koncentrációjú Leu-enkefalin oldatokkal egy éjszakán át inkubáltuk, majd lecentrifugáltuk és a felülúszót vizsgáltuk. A felülúszó Leu-enkefalin koncentrációja reprezentálja a megkötött peptid mennyiségét, melyet spektrofotometriás mérésekkel (232 nm) határoztunk meg. Az adszorpciós izoterma meghatározható: ábrázolva a felülúszók egyensúlyi koncentrációit (C_{equ} , [$\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$]) az adszorbeált mennyiség (m_{ads} , [μg]) függvényében (1./A ábra). A görbét linearizálva C_{equ} -t ábrázoltuk a $C_{\text{equ}}/m_{\text{ads}}$ függvényében. Ezen adatok a Langmuir elméleti linearizált adszorpciós modellhez jól illeszkednek, mind C60(30) és C30 esetén a lineáris regresszió 0,994 (1./B ábra). A 1./B ábrán látható egyenesek meredekségének reciprokából kiszámítható a fázisok kötőkapacitása.



1. ábra: (A) C60(30) és C30 fázisokon mért Leu-enkefalin adszorpciós izotermája 25°C-on. (B) Az izoterma linearizált formája. Az egyenesek meredekségének reciprokából kiszámítható a fázisok kötőkapacitása

C60(30) fullerén-szilika kötőkapacitása $31,5 \text{ mg} \times \text{g}^{-1}$, melyet egy korábbi közleményben foszfopeptidekre mért $33,6 \text{ mg} \times \text{g}^{-1}$ is megerősít. C30-szilika fázis esetén $153,9 \text{ mg} \times \text{g}^{-1}$, mely ötször nagyobb kötőkapacitást mutat.

Fázisok összehasonlítása a HSA és fibrinogén emésztmény lépcsőzetes frakcionálásán alapuló szekvencia lefedettség alapján

HSA és fibrinogén emésztményeket **frakcionáltunk** minden egyes SPE fázison (**C18, C30, C60(10), C60(30), C60(100)**). 20 pmol HSA emésztmény frakcionálásakor C18 és C30 fázisokon jobb eredmény született, mint a C60-fullerén-szilikákon, azaz a HSA aminosavainak 80,51%-át azonosítottuk a C18 fázison történő peptid frakcionálás után. Ez az érték HSA aminosavainak 80,68% C30-szilikán C60(30)-fullerén-szilika esetében 70,77%-a. C18 és C60(100) szilikán végzett frakcionálás hasonló szekvencia lefedettséget mutatott a fibrinogén teljes szekvenciáját tekintve (41,5% és 43,4%), habár a B β -láncra C60(100)-fázison kissé nagyobb szekvencia lefedettség volt elérhető. Míg akár a C30 és C60(30)-fázisokon az A α - és B β -láncra hasonló eredményt értünk el, a c-láncon 64,9% volt, mely 62,15%-ra emelte a teljes szekvencialefedettséget, míg C30-fázison 55,57% volt.

A HSA és fibrinogén lehetséges glikációs helyek meghatározása frakcionálás után, az SPE kísérletek eredményeinek összehasonlítása

A glikált HSA a diabétesz egy kiváló markere és egy középtávú glikációs indexe lehet a körülbelül 20 nap féléletidejével. A glikált HSA szerepe a diabétesz különböző stádiumainak meghatározására már igazolt, lehetséges glikációs helyei széles körben vizsgáltak.

A fibrinogén jelentős szerepet játszik a diabéteszben szenvedő betegek kardiovaszkuláris betegségeinek növekedésében, mivel fibrinogénszint emelkedett és a fibrinogén nemenzimatis glikáción mehet keresztül diabéteszes betegekben nemkontrollált vércukorszint esetén.

Ebben a munkában az Amadori termékek meghatározása (glükóz molekulák reakcióba lépnek a fehérje szabad aminos csoportjaival, mellyel glikozilamin egységek jönnek létre egy reverzibilis folyamat következtében, később a glikozilamin Amadori átrendeződésen megy keresztül, mely egy stabil fruktozil amint hoz létre. Ez a fruktozil lizin volt vizsgálatunk tárgya.

A **HSA** össze lehetséges glikációs helyét, melyeket a C30-szilika és C60(30)-fullerén-szilikán azonosítottunk, a nemfrakcionált emésztményben találtakkal hasonlítottuk össze. 69 lehetséges glikációs helyet határoztunk meg, ezekből 59-et már korábbi irodalmi adatok is tartalmaznak. Az SPE frakcionálás lehetővé tette a nemfrakcionált emésztményben találtakon

kívüli glikációs helyek azonosítását. Tíz eddig ismeretlen glikációs helyet határoztunk meg: R81, K93, R98, K106, R114, R337, R348, R521, K560, K564.

A **fibrinogén** $A\alpha$ -láncán 72 módosítási helyet találtunk, de az emésztményben ebből csak 41 volt azonosítható. C30-szilika alkalmazásával 67, C60(30)-fullerén-szilikával pedig 63 glikációs hely volt meghatározható.

A $B\beta$ -láncan az összes módosítási helyből (59) 25-öt sikerült az emésztményben azonosítani, míg ez a szám a frakcionálással C30-szilika esetén 53-ra, C60(30) esetén 47-re növekedett. Negyvenegy lehetséges glikációs helyet találtunk a fibrinogén c -láncán. Ebből 24-t azonosítottunk az emésztményből, C30-szilika alkalmazásával 33-t, C60(30)-szilikával pedig hasonló eredményt, 34-t kaptunk.

Boronát affinitás kromatográfiával végzett kísérletek eredményei

Boronát affinitás gél kötési körülményeinek meghatározása

Az amperometriás mérési módszer hasznosnak bizonyult az optimális **kötőpuffer ionerősségének és pH-jának** valamint az elúciós körülmények optimalizálásához. Az eredmények jól demonstrálják, hogy az affinitás pipettahegyek a legnagyobb mennyiségű glükózt pH 7,7 és 8,2 között kötik meg. A pH további növelése a megkötött glükóz mennyiségének csökkenését eredményezi. A maximális kötőkapacitás a görbén pH 7,8 és 8,2 közötti tartományba esett, ezért a választott pH 8,2 lett.

Ha a pipettahegy kötőkapacitását a kötőpuffer ionerősségének függvényében ábrázoltuk, a legjobb eredményt a 150 mM-os ammóniumklorid/ ammónia puffer nyújtotta.

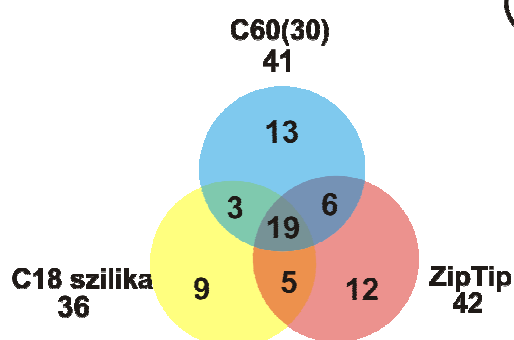
Az **eluens pH-jának hatását** vizsgálva az eluált glükóz mennyiségének függvényében, az összefüggés exponenciális. Minél alacsonyabb az eluens pH-ja, annál nagyobb az eluált glükóz mennyisége. Bórsavval módosított agarózgélről az elúció kivitelezhető magas koncentrációjú szorbitol oldattal is. Ábrázolva az eluált glükóz mennyiségét a szorbitol **oldat koncentrációjának** függvényében, a görbe 1,2 M szorbitol koncentrációnál platót ér el, így nem szükséges nagyobb koncentrációjú szorbitol oldatot alkalmazni.

Boronát affinitás pipettahegyek alkalmazása glikált peptidek dúsítására glikált HSA triptikus emésztményéből

Optimalizált körülményeket (beleértve a kötőpuffer ionerősségét, pH-ját és a különböző elúciós eljárásokat) alkalmaztunk 28 napig *in-vitro* glikált HSA emésztmény dúsítására. Először az elúció 1,2 M szorbitol oldattal történt. Optimalizált körülmények között a glikált peptidek dúsítása ammónium-klorid/ammónia és taurin pufferrel, mindkét esetben azonos pH-val (8,2) és azonos koncentráció (150 mM) alkalmazásával történt. A MALDI-TOF analízis előtt glikált HSA peptidek szorbitollal történő elúciója után az eluátum **sómentesítésére** volt szükség. A sótlanítást 3 különböző szorbenssel végeztük: a kereskedelmi forgalomban kapható ZipTip-pel, C60(30) fullerén-szilikával és egy, a laboratóriumunkban készült C18-szilika töltettel. A kísérleti körülmények (beleértve a kötőpuffer összetételét, a szorbitollal és hangyasavval történő elúció, és a 1,2 M-os szorbitol oldattal történő elúció utáni különböző szorbensekkel kivitelezett sómentesítés) összehasonlítása a 28 napig glikált HSA egyszerűen glikált peptidjeinek és glikációs helyeinek számán alapult. Az eredményeket Venn diagramok segítségével mutatjuk be.

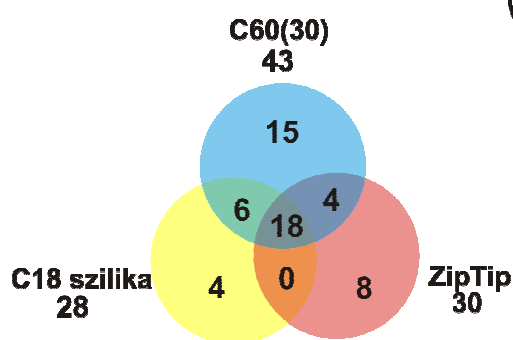
Ammóniumklorid/ammónia puffer

Egyszeresen glikált peptidek száma



Taurin puffer

Egyszeresen glikált peptidek száma



2. ábra: Az egyes fázisok összehasonlítása, a szorbitollal történő elúció esetén (A) Venn diagram a detektált egyszerűen glikált peptidek számát ábrázolja (ammóniumklorid/ammónia kötőpufferrel optimalizált körülmények között) (B) Venn diagram taurin kötőpufferrel dúsított egyszerűen glikált peptidek számát mutatja

A 2. ábrán ammóniumklorid/ ammónia és taurin kötőpufferrel dúsított egyszeresen glikált peptidek számát hasonlítottuk össze. Mindkét esetben a megkötött peptideket 1,2 M szorbitol oldattal eluáltuk és a korábban említett fázisokkal sómentesítettük. Ahogy a megkötött és az egyes fázisokról eluált glikált peptidek számán is látszik az ammóniumklorid/ammónia puffer hatékonyabbnak bizonyult, mint a taurin puffer. Ammóniumklorid/ammónia pufferrel 67 egyszeresen glikált peptid, míg taurin pufferrel 55 egy cukor egységgel módosított peptid volt azonosítható az összes alkalmazott fázis segítségével.

A sómentesítés után a teljes egyszeresen glikált peptidkészletből 13 egyedi peptidet kötöttek meg a C60(30)-as részecskék (41-ből) az ammóniumklorid/ammónia puffer esetén (2./A ábra). A 2/B ábra egyedi egyszeresen glikált peptideket mutatja, melyek a C60(30) részecskéken kötődtek meg taurin puffer jelenlétében. Összességében, az eluált peptidek közül 43-t tudtunk azonosítani a C60(30)-cal történő kisózás után. A 43 egyszeresen glikált peptidből 15 csak a C60(30) fullerén-szilikával volt azonosítható, a többi 28-t a másik két fázis alkalmazásával is. Fontos megjegyezni, hogy ez a 15 egyedi glikált peptid csak ebben az összehasonlításban (a 3 különböző szorbens) tekinthető egyedinek. Ha az egyedi peptideket, melyeket a C60(30) SPE fázis eluátumában detektáltunk, mindkét korábban említett kötőpufferrel történő dúsítás után hasonlítottuk össze, azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az egyedi peptidek száma nagyon hasonló egymáshoz. Ammóniumklorid/ammónia puffer esetén 13, taurin puffer esetén 15 peptidet azonosítottunk. Csak 5 azonos szekvenciájú egyszeresen glikált peptidet és módosítási helyet tudtunk meghatározni a 2 kötőpufferrel, sómentesítve a C60(30) fázissal. Az egyedi peptidek többségét eltérőnek találtuk, annak ellenére, hogy azonos szorbensről eluáltunk. Ez a megállapítás megmutatja, hogy a különböző kötőpufferek módosítják a boronát fázis szelektivitását, mivel a kidúsított peptidprofil és a meghatározott lehetséges glikációs helyek nagy változatosságot mutatnak.

Ammóniumklorid/ammónia kötőpuffert alkalmazva a glikált peptidek dúsítására, ahogy korábban is említettük 41 egyszeresen glikált peptid kötődött. Továbbá 13 egyedi peptidet fedeztünk fel a peptidkészletben, ezek 8 lehetséges glikációs helyet tartalmaznak, nevezetesen K106, R114, R257, R348, K372, K436, K439 és K466.

A fenti eredményeket vetettük egybe azokkal, melyekhez taurin kötőpuffer alkalmazásával jutottunk. Ezen peptidek között, melyeket az affinitás hegyekről szorbitollal eluáltunk és C60(30) fázison sómentesítettünk 15 egyszeresen glikált egyedi peptid és kilenc egyedi glikációs hely volt: K190, K372, K413, K444, R445, K466, K536, K538 és K541.

A *ZipTip* egy kereskedelmi forgalomban kapható termék, talán az egyik leggyakrabban és leghatékonyabban tömegspektrometriai vizsgálatok előtt proteinek és peptidek sómentesítésére alkalmazott eszköz. 12 egyszeresen glikált egyedi peptid azonosítását tette lehetővé ammóniumklorid/ammónia kötőpuffer és *ZipTip* alkalmazása sómentesítésre a következő egyedi glikációs helyekkel: K93, R98, K402 és K524. Az egyedi glikációs helyeket tekintve az egyedi glikált peptideken, a *ZipTip* nem tűnik olyan hatékonynak, mint a C60(30), habár meg kell jegyezni, 42 glikált peptid volt azonosítható a *ZipTip*-en és 58 lehetséges glikációs hely.

Taurin kötőpufferre vonatkozóan az egyszeresen glikált peptideket tekintve a *ZipTip* rosszabb eredményt mutatott a C60(30)-hoz képest, csak 30 peptid kötődött, ezekből 8 volt egyedi. A *ZipTip*-en megkötődött peptidek glikációs helyeit összeszámolva 54-t találtunk, C60(30) fázissal alig többet, 61-t. Ebből 6 egyedi glikációs hely volt meghatározható: K402, K432, K313, K317, K500 és R485.

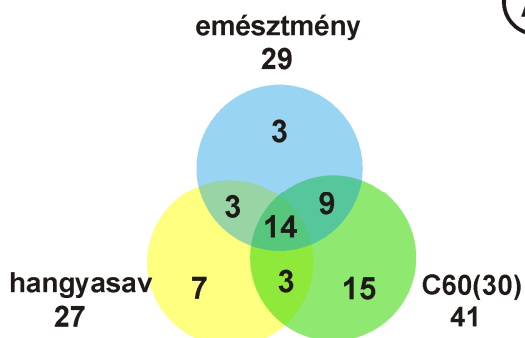
Végül a glikált peptidek sómentesítését nagyborítottságú **C18-szilika** fázissal is kipróbáltuk. Ammóniumklorid/ammónia puffer alkalmazásával 36 egyszeresen glikált peptid kötődött, ebből 9 volt egyedi, a következő glikációs helyekkel K199, K317, K276, K564 és K573. Ennek a fázisnak a gyenge teljesítményét a hidrofil glikált peptideket illetően jól kifejezi az egyedi peptidek száma: 6, 4 egyedi lehetséges glikációs helyel: R98, K413, K414 és R428. Taurin pufferrel dúsítva, C18 fázissal sómentesítve még gyengébb eredményt kaptunk. Összességében 28 egyszeresen glikált peptidből 4 egyedi peptid volt meghatározható, melyek egyetlen egyedi glikációs helyet sem tartalmaztak.

A boronát affinitás fázisokról a megkötődött komponensek **elúciójára** gyakran alkalmaznak savas környezetet. A 2-es pH-jú **hangyasav** oldat bizonyult a leghatékonyabbnak D-glükóz mennyiségét illetően, az amperometriás mérések alapján. Ezzel az oldattal végzett elúciót összehasonlítottuk a szorbitollal történő elúcióval (sómentesítés C60(30) fázissal) tekintetbe véve az egyszeresen glikált peptidek és a lehetséges glikációs helyek számát. Dúsítás hatékonyságának megállapítására 28 napig glikált HSA nemdúsított emésztményét összehasonlítottuk az elúció fent említett két módjával. Meglepően azt tapasztaltuk, hogy az elúció hangyasavval szolgáltatva a legrosszabb eredményt, a meghatározott glikált peptidek és a lehetséges glikációs helyek számát tekintve.

Ammóniumklorid/ammónia puffer

Egyszeresen glikált peptidek száma

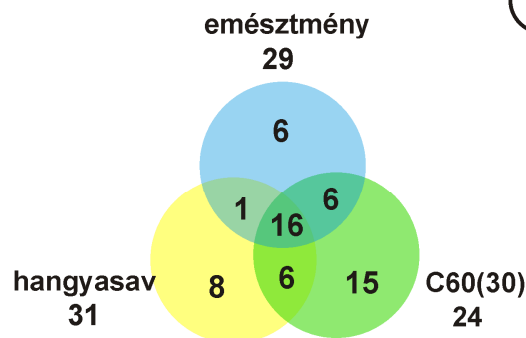
(A)



Taurin puffer

Egyszeresen glikált peptidek száma

(B)



3. ábra: Affinitás pipettaheggyel dúsított, 28 napig glikált HSA emésztmény elúciójának összehasonlítása (az azonosított glikált peptidek számának feltüntetésével) (A) A Venn diagram az ammóniumklorid/ammónia kötőpufferrel dúsított egyszeresen glikált peptidek számát mutatja (B) Taurin kötőpufferrel dúsított egyszeresen glikált peptidek Venn diagramja

A 3. ábrán látható, hogy 100 pmol túlglikált HSA dúsítás nélküli emésztményből 29 egyszeresen glikált peptidet azonosítottunk, ebből 3 volt egyedi, 5 egyedi glikációs hellyel. Ammóniumklorid/ammónia kötőpufferrel és hangyasavas elúcióval 27 egyszeresen glikált peptidet nyertünk vissza, ebből 7 volt egyedi 4 lehetséges glikációs hellyel. Ahogy korábban is említettük a szorbitol oldat alkalmazása 41 egyszeresen glikált peptidet szolgáltatott annak ellenére, hogy az eluátumot C60(30) részecskéken a MALDI-TOF tömegspektrometriás vizsgálat előtt sómentesítésnek vetettük alá. Viszont ebben az összehasonlításban 15 egyedi peptid és 12 egyedi glikációs hely volt meghatározható. A 3. ábráról az is leolvasható, hogy a hangyasavas elúció 11 peptid meghatározását tette lehetővé. A szorbitolos elúció és sómentesítés ismét a legjobb eredményt mutatta, 24 peptid azonosítottunk, ebből 14-t egyedinek találtunk, melyeken 16 egyedi glikációs hely volt.

A 3./B ábra azt az esetet mutatja, amikor a glikált peptidek dúsítására **taurin kötőpuffer** alkalmaztunk. Röviden, az emésztményből 29 egyszeresen glikált peptidet detektáltunk ebből 6 volt egyedi, mindegyik 3 egyedi glikációs hellyel. A hangyasavval eluált 31 egyszeresen glikált peptidből 8 volt egyedi 4 lehetséges glikációs hellyel. Szorbitollal történő elúcióval 43 egyszeresen glikált peptidet tudtunk meghatározni, ebből 15 volt egyedi és 8 egyedi glikációs helyet foglalt magába. Ahogy korábban is bemutattuk a megkötött glikált peptidek elúciója hangyasavval, hasonló eredményt mutatott, mint a módosított peptidek dúsítás nélküli vizsgálata, annak ellenére, hogy a legnagyobb glükóz mennyiséget

pH 2 mellett lehetett mérni. Ezen eredmények alapján a savval történő elúciót munkacsoportunk nem javasolja.

A leghatékonyabb mód, hogy információt nyerjünk a fehérjék glikációval módosított helyeiről MALDI-TOF tömegspektrométerrel például: a dúsítás ammóniumklorid/ammónia kötőpufferrel történjen optimalizált körülmények között, ezután a szelektíven kötött komponensek elúcióját magas koncentrációjú cukoroldattal, például szorbitollal végezzük. Továbbá az analízis előtt a nemkívánatos cukor eltávolítható egy hatékony szorbenssel, amint látható volt C60(30) és ZipTip egyformán hatékonynak bizonyult, szignifikáns különbség nem volt észlelhető.

Boronát affinitás pipettahegy alkalmazása Amadori termékek szelektív dúsítására kettestípusú diabéteszben szenvedő betegek és egészséges önkéntesek vérérszérumból gyűjtött HSA emésztményből

Négy egészséges önkéntes és 4 kettestípusú diabéteszben szenvedő beteget választottunk ki arra, hogy ellenőrizzük a fent leírt módszert HSA glikációs szintjének feltérképezésére. A betegeket HbA1c és éhgyomri vércukorszintjük alapján választottuk ki. Egészséges önkéntesnek néhány más klinikai paraméter mellett, az éhgyomri vércukorszintjük sohasem volt több mint $6,1 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$. Ezek viszont az 1-es és 2-es betegeknél messze a legmagasabbak voltak ($12,17$ és $13,02 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$). A 3-as és 4-es betegeknél kissé alacsonyabb volt a mért érték ($8,53$ és $7,5 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1}$). Mind a 4 vizsgált beteg HbA1c értéke meglehetősen magas volt ($10,30$; $11,50$; $11,82$; és $11,30\%$ a betegek sorrendjében 1-4). Ez a 2 adatsor szolgált a betegek glikémiás paramétereinek meghatározására. A HSA sokkal hamarabb reagál a vércukorszint változására, mint a HbA1c, továbbá figyelembe véve a rövid biológiai féléletidejét (17 nap) a HSA glikációs szintje relevánsabb a vércukor állapotára, a vizsgálatot megelőző 2 hétre.

Körülbelül $300 \text{ } \mu\text{g}$ HSA emésztményt, melyet mind a 4 betegtől és a 4 önkéntestől gyűjtöttünk, optimalizált körülmények között boronát affinitás pipettahegyekkel dúsítottuk. A megkötött peptideket $1,2 \text{ M}$ szorbitol oldattal nyertük vissza. Az eluátumot C60(30) fázison sómentesítettük és bekonzentráltuk. A mintaelőkészítés után maradt peptidek tömegét MALDI-TOF tömegspektrométerrel határoztuk meg.

Az elsődleges glikációs helyek (K12, K233 és K525) mellett, mely minden beteg és kontrol egyén esetében megtalálható volt, sok más korábban leírt glikált lizint (K) és arginint (R) meghatároztunk. A glikált peptidek és a lehetséges glikációs helyek számát tekintetbe véve, a

4-es beteget kivéve (akinek az éhgyomri vércukorszintje alacsonyabb volt) a klinikai paraméterek összeilleszthetők a tömegspektrometriai mérésekkel nyert glikációs mintázattal.

Vizsgáltuk a peptidek 144,042 Da-os tömegnövekedését is, ami a FL 1 vízvesztés után vagy arginin oldallánchoz kapcsolódó tetrahidropirimidin. Az eredmények azt mutatják, hogy az 1077.519 és 1783.938 m/z értéknél megjelenő peptidek figyelemre méltók. Az utóbbi glikált peptid minden vizsgált beteg HSA emésztményében jelen volt, de az egészséges önkéntesekéből hiányzott. A 144,042 m/z módosítás jelenlétét tömegspektrometriai mérésekkel igazoltuk, mely azt mutatta, hogy a módosítási hely K414 vagy R428 pozícióban lehet. Az előbbihez hasonlóan az 1077,519 m/z peptid 3 diabéteszes betegnél volt megtalálható, mely módosítás R81 pozícióban arginin oldallánchoz kapcsolódó tetrahidropirimidin.

További beteg és kontrol egyének vizsgálata szükséges, annak eldöntésére, hogy ez a 2 peptid a lehetséges módosításokkal a diabétesz mellitusz potenciális biomarkereként szolgálhat. A kidolgozott módszerünk egy hatékony eszköznek bizonyult a nemenzimatis glikáció vizsgálatában.

A disszertációban szereplő új eredmények

I. C30 és C60(30) fullerén-szilika kötőkapacitásának megállapítása Leu-enkefalin segítségével

Az aktiválás és ekvibrálás után C30-szilika és C60(30) fullerén-szilika szemcséket különböző koncentrációjú Leu-enkefalin oldatokkal egy éjszakán át inkubáltunk. A felülúszók koncentrációi reprezentálják az egyensúlyi, adszorbeált Leu-enkefalin mennyiségét. Az adszorpciós izoterma megadható a felülúszók egyensúlyi koncentrációját (C_{equ}) ábrázolva az adszorbeált mennyiségek függvényében. Ábrázolva az egyensúlyi koncentrációkat (C_{equ}) a $C_{\text{equ}}/m_{\text{ads}}$ függvényében, az adatok a Langmuir elméleti adszorpciós modellhez kiváló lineáris regresszióval illeszkednek. A **C60(30) kötőkapacítása** $31,5 \text{ mg} \times \text{g}^{-1}$, amit alátámaszt egy korábban publikált eredmény is. **C30-szilika** esetében ez az eredmény $153,9 \text{ mg} \times \text{g}^{-1}$, ami ötszörös kötőkapacitást mutat.

II. Triptikus emésztmények szekvenciafedettségének megállapítása C18, C30 szilika és C60(10), C60(30), C60(100) fullerén-szilika fázisokon

Hús pmol HSA emésztményt frakcionáltunk minden egyes fázison (C18, C30, C60(10), C60(30), C60(100)). C18 és C30-szilika nagyobb szekvenciafedettséget (kb 80%) adott, mint a C60 fullerén-szilikák.

Hús pmol fibrinogén frakcionálása esetén a **C30 és C60(30)** szorbensek közel azonos eredményt mutattak a fibrinogén A α - és B β -láncain, de nagy növekedés volt megfigyelhető a c-láncnál C60(30) fázison, ami 62,15%-os legjobb szekvenciafedettséget eredményezett (az egész fibrinogén molekulára nézve). A peptidek hidrofób tulajdonsága és hossza fontos szerepet játszik, mivel ezeknek a peptideknek nagyobb a hozzáférése a hosszú alkiláncokhoz, így a kialakult kölcsönhatások erősebbek, mint a gömb alakú C60 molekula esetében. A c-lánc legmagasabb aromás aminosav tartalmának köszönhetően a peptidek és a fullerén között a π - π kölcsönhatás fontosabb szerepet játszik, mint az A α - és B β -láncokon.

III. Humán szérum albumin (HSA) és fibrinogén glikációs helyeinek meghatározása C30 és C60(30)- fázisokon

28 napig glikált HSA-t frakcionáltunk C60(30) és C30 szilárd fázisokon, az így kapott eredményt összehasonlítottuk nemfrakcionált glikált HSA emésztménnyel. Összesen 69 lehetséges glikációs helyet azonosítottunk, ezek közül **10-t még nem írt le az irodalom**. Ezt az új információt az SPE frakcionálás szolgáltatta, viszont a nem frakcionált emésztményből nem voltak meghatározhatóak.

A glikált fibrinogén emésztmény frakcionálásának eredményét nem tudtuk irodalmi adatokkal összehasonlítani, mivel nem volt feljegyzés róla. Az A α -lánc szekvenciájában 72 módosítási helyet találtunk, 67-t C30-szilikán, 63-t C60(30) fázison az SPE frakcionálás során. B β -láncon az összes módosítási helyből 59-t, C30-szilikán frakcionálással csaknem ugyanannyit, 53-t és C60(30)-cal 47-t találtunk. 41 lehetséges glikációs helyet mutattunk ki a fibrinogén c-láncán, C30 szilikát alkalmazva 33-at és C60(30)-t 34-et, nagyon hasonló eredmény született. A c-lánc glikációja az R8, R35, R123, R246 és R421 csak a C60(30) fázison volt megtalálható. A fibrinogén lehetséges glikációs helyeit munkacsoportunk írta le először.

A glikált peptidek kutatásában C30-szilika a C60(30)-nak versenytársa lehet a glikált peptidek és a glikációs helyek számát illetően. A fázisok szelektivitása különböző, míg a C30-szilika a hosszabb peptideket, addig a C60(30) kiváló kötőkapacitással rendelkezik a hidrofil, argininben gazdag peptideket tekintve.

IV. Különböző elúciós körülmények optimalizálása boronát affinitás pipettahegyeken

A miniatürizált boronát affinitás kromatográfia optimális módszer a nemenzimatikusan glikált peptidek szelektív dúsítására. A megfelelő kötési feltételek ismertek (**150 mM ammóniumklorid/ammónia puffer, pH=8,2**), de az elúciós körülményeket még senki sem optimalizálta. Az eluált glükóz mennyiségéből az optimális elúciós eljárást elektrokémiai mérések segítségével választottuk ki. Az elúciót savas körülmények között, vagy magas koncentrációjú szorbitol oldattal is elvégezhető. **1,2 M-os szorbitol oldattal** végzett elúció hatékonyabbnak bizonyult, mint a 2-es pH-jú hangyasav oldat, annak ellenére, hogy minél savasabb oldatot alkalmazunk, annál hatékonyabb a savas elúció. Hangyasavval 27 egyszeresen glikált peptidet, míg szorbitollal 41-t tudtunk azonosítani (ammóniumklorid/ammónia kötőpufferrel dúsítva).

V. Glikált peptidek sótlanítása különböző szorbenseken

A szorbitollal eluált glikált peptideket MALDI-TOF tömegspektrometriás analízis előtt minden esetben sómentesíteni szükséges. Ezt 3 különböző típusú fázissal: a kereskedelmi forgalomban kapható ZipTip-pel, C60(30) fullerén-szilikával és a házi készítésű C18-szilikával végeztük. Az 1,2 M-os szorbitol oldattal történő elúció után a kiértékelés a 28 napig glikált HSA egyszeresen glikált peptidjeinek és a lehetséges glikációs helyeinek száma alapján történt.

Az ammóniumklorid/ammónia puffer bizonyult a leghatékonyabbnak a boronát affinitás kromatográfiában, a glikált peptidek szelektív dúsítására. Ahogy a Venn diagramok is mutatják 41 egyszeresen glikált peptid kötődött meg a C60(30) fázison, ebből 13 volt egyedi 8

lehetséges glikációs hellyel. Míg ZipTip-et alkalmazva 42 glikált peptidet találtunk, ebből 12 volt egyedi, 4 egyedi glikációs hellyel.

A C18 fázis nem volt megfelelően alkalmazható, tekintve a megkötött glikált peptidek számát. Az egyszeresen glikált peptidek és a lehetséges glikációs helyek számát figyelembe véve C60(30) fullerén-szilika hasznos szorbensnek bizonyult, továbbá hatékonysága versenyképes volt a kereskedelmi forgalomban kapható ZipTip-ével.

VI. Az újonnan fejlesztett módszer alkalmazása glikált peptidek meghatározására humán szérum albumin emésztményből, melyet kettestípusú diabéteszben szenvedő betegek és egészséges önkéntesek véréből gyűjtöttünk

Az új módszer alkalmazhatóságát az egészséges önkéntesek és kettestípusú diabéteszes betegek HSA emésztményének vizsgálatán mutattuk be. Habár mind a kontrol, mind a diabéteszes betegcsoport csak 4 fős volt, **több glikált peptidet** és ebből következően **több glikációs helyet** ismertünk fel a kettestípusú diabéteszben szenvedő betegcsoportnál. A diabéteszben szenvedő betegek nem megfelelően beállított vércukorszinttel rendelkeztek az Amadori termékek vizsgálatakor.

Az elsődleges glikációs helyek (K12, K233 és K525) minden egyes szérum mintában előfordultak. Az eredmények azt mutatják, hogy az 1077,519 m/z-nél és 1783,938 m/z-nél megjelenő peptidek figyelemre méltóak, habár az 1077,519 m/z-jű peptid csak 3 diabéteszben szenvedő beteg szérumában fordult elő. Ez a módosítás az R81-es pozíciójú argininre lokalizálódik.

A fruktozil-lizin egy vízvesztés után (FL-18) vizsgálatakor **1783,9 m/z-nél** megjelenő peptid minden diabéteszben szenvedő betegnél megfigyelhető volt, de a kontrol mintákból hiányzott. Ez a peptid a HSA [414-428]-as régiójára lokalizálódik és a K414 illetve R428 glikációs helyeket foglalja magába. Ez a peptid és a glikációs helyei a **diabétesz egy lehetséges biomarkereiként** szolgálhatnak, habár további kutatások szükségesek a megfigyelés megerősítésére.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek Dr. Ohmacht Róbert professzor úrnak és Dr. Deli József programvezető úrnak támogatásukért.

Hálával tartozom társtémavezetőmnek Dr. Szabó Zoltánnak, aki nélkül a dolgozathoz szükséges kísérletek nem jöhettek volna létre, aki mind értékes ötleteivel mind anyagilag segítette a munka megvalósítását.

Szeretném megköszönni Dr. Takátsy Anikónak, hogy biztatásával és értékes meglátásaival segítette a dolgozat megírását.

Továbbá szeretném köszönetemet kifejezni a II-es számú Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum igazgatójának, Dr. Withmann István professzor úrnak, és Dr. Markó Lajosnak a klinikai minták akkurátus kiválasztásáért, és kitartó gyűjtéséért.

Köszönöm az innsbrucki Leopold-Franzens Egyetem, Analitikai és Radiokémiai Intézet vezetőjének Günther K. Bonn professzor úrnak és Thomas Ringernek az LC-MS mérések kivitelezését.

Köszönettel tartozom Dr. Nagy Géza professzor úrnak és Nagyné Dr. Zengő Líviának egyetemünk Általános és Fizikai Kémiai Intézet munkatársainak az amperometriás mérésekért.

Köszönöm Rébék-Nagy Gábornak a dolgozatom nyelvi lektorálását.

Továbbá köszönettel tartozom mindazoknak, akik nevét nem említettem, de segítséget nyújtottak a kísérletek elvégzésében.

Végül, de nem utolsósorban hálás köszönettel tartozom családomnak, akik vég nélkül bíztattak és támogattak a munka elvégzése és a dolgozat megírása alatt.

Publikációs lista

Publications related to this thesis: (A dolgozathoz kapcsolódó publikációk)

1. **Böddi, K.**, Takátsy, A., Szabó, Sz., Markó, L., Márk, L., Wittmann, I., Ohmacht, R., Montskó, G., Vallant, R.M., Ringer, T., Bakry, R., Huck, C.W., Bonn, G.K. and Szabó, Z., Use of fullerene-, octadecyl-, and triacontyl silica for solid phase extraction of tryptic peptides obtained from unmodified and *in-vitro* glycated human serum albumin (HSA) and fibrinogen, J. Sep. Sci., 32 (2) (2009) 295-308., **IF.: 2.745 citation: 6(3)**
2. Takátsy A., **Böddi, K.**, Nagy, L., Nagy, G., Szabó, S., Markó, L., Wittmann, I., Ohmacht, R., Ringer, T., Bonn, G.K., Gjerde, D., Szabó, Z., Enrichment of Amadori-products derived from the non-enzymatic glycation of proteins using microscale boronate affinity chromatography, Anal. Biochem., 393 (2009) 8-22., **IF: 3.287 citation: 5(4)**

Other publications (További publikációk):

3. Szabo, Z., **Böddi, K.**, Mark, L., Szabo, G., Ohmacht, R.: Analysis of nitrate ion in nettle (*Urtica dioica* L.) by ion-pair chromatographic method on a C30 stationary phase, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (12) (2006) 4082-4086., **IF.: 2.322 citation: 3 (3)**
4. Avar, P., Pour Nikfardjam, M.S., Kunsági-Máté, S., Montskó, G., Szabó, Z., **Böddi, K.**, Ohmacht, R. Márk, L. Investigation of Phenolic Components of Hungarian Wines. International Journal of Molecular Sciences, 10 (8) (2007) 1028-1038., **IF.: 0.7500 citation: 12 (9)**
5. Montsko, G., Pour Nikfardjam, M.S., Szabo, Z., **Böddi, K.**, Lorand, T., Ohmacht, R. and Mark, L.: Determination of products derived from trans-resveratrol UV photoisomerisation by means of HPLC–APCI-MS, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 196 (2008) 44-50., **IF.: 2.362 citation: 9 (9)**
6. Marko, L., Molnar, G.A., Wagner, Z., **Böddi, K.**, Koszegi, T., Szabo Z., Matus, Z., Szijarto I., Merei, A., Nagy G., Wittmann, I., Measurement of modification and interference rate of urinary albumin detected by size-exclusion HPLC, Physiological Measurement, 30 (2009) 1137-1150., **IF: 1.4 citation: 1(1)**

7. Marko, L., Szigeti, N., Szabo, Z., **Boddi K.**, Takatsy, A., Ludany, A., Kőszegi, T., Molnar, G.A., Wittmann, I., Potential urinary biomarkers of disease activity in Crohn's disease, Scandinavian Journal of Gastroenterology, 45 (12) (2010) 1440-1448., *IF:2.08 citation 1(1)*
8. Markó, L., Mikolás E., Molnár, G.A., Wagner, Z., Kőszegi, T., Szijártó, I. A., Mohás, M., Matus, Z., Szabó, Z., **Böddi, K.**, Mérei, Á., Wittmann, I. Normo- és microalbuminuriás cukorbetegekben a HLCp-vel mért vizeletalbumin-fluoreszcencia a vesefunkciós paraméterekkel függ össze, nem a glikémiás értékkel, Diab. Hung., 17 (3) (2009) 229-238.

Abstracts (Absztraktok):

1. Ludany, A., Kőszegi, T., **Boddi, K.**, Szabo, Z., Kovacs, G.L. Human Tear Proteins as an Analytical Tool in Laboratory Medicine Euromedlab 2009 Innsbruck, Austria *IF:1.88 citation: 0(0)*
2. Szalma, J., **Böddi, K.**, Lempel, E., Szabó, Z., Nyárády, Z., Olasz, L., Takátsy, A., Protein Identification from Submandibular Salivary Stones with MALDI TOF Mass Spectrometry, J. Craniomaxillofac. Surg., 2010 *IF:1.36 citation: 0(0)*

Poszterek (Posztterek):

1. Szabó Z., **Böddi K.**, Ohmacht R., Az "utánszilanzálás" hatása a retencióra, Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2002. Lillafüred, Hungary
2. Szabó Z., Ohmacht R., Szabó L., **Böddi K.**, Anionok ionpár.kromatográfiás elválasztása C30 fázison. Csalán (Urtica dioica L.) nitrátion-tartalmának meghatározása ionpár-kromatográfiával Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2004. Hévíz, Hungary
3. Szabó, Z., **Böddi, K.**, Márk, L., Szabó, L. Gy., Ohmacht, R., New HPLC Method for the Determination of Nitrate ion from Nettle (Urtica dioica L.) 6th Balaton Symposium 2005 Siófok, Hungary
4. Montskó, G., Vető, S., Márk, L., **Böddi, K.**, Dolowschiák, T., Kanizsai A., Doppler, H., Ohmacht, R., Biokompatibilis fullerén oldatok analitikai és toxicológai vizsgálata 37. Membrán-transzport Konferencia – Sümeg, 2007. május
5. **Böddi, K.**, Markó, L., Kőszegi, T., Jelinek, L., Márk, L., Montskó G., Ohmacht, R., Szabó, Z., Wittmann, I., Vizelet albumin karakterizálás tömegspektrometriás,

- folyadékkromatográfiás és nephelometriás módszerrel, Centenáriumi Vegyészkonferencia, 2007. Sopron, Hungary
6. Montskó, G., Avar, P., Szabó, Z., **Böddi, K.**, Takátsy, A., Ohmach, R., Márk, L. Villányi borok polifenol összetételének vizsgálata HPLC-MS és LDI TOF módszerekkel Centenáriumi Vegyészkonferencia, 2007. Sopron, Hungary
 7. Montskó, G., Szabó, Z., **Böddi, K.**, Takátsy, A., Ohmacht, R., Wölfling, J., Mernyák, E., Márk, L. Szteránvázas hormonok kimutatása biológiai mintákból MALDI-TOF tömegspektromet-riával Centenáriumi Vegyészkonferencia, 2007. Sopron, Hungary
 8. Gulyácssy, P., **Böddi, K.**, Markó, L., Márk, L., Wittmann, I., Ohmacht, R., Süngi, B., Vallant R. M., Huck Ch. W., Bakry, R., Bonn, G. K., Szabó, Z. Improvement of the Sequence Coverage Applying Different Matrices, Solid Phase Extraction (SPE) and HPLC Separation of the Tryptic Digest of Human Serum Albumin (HSA) by Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Mass Spectrometry (MALDI)-A comprehensive study 7th Balaton Symposium 2007 Siófok, Hungary
 9. Avar, P., Pour-Nikfardjam, M. S., Montskó, G., Szabó, Z., **Böddi, K.**, Ohmacht, R., Márk, L. Antioxidant Analysis of Hungarian Red Wines 7th Balaton Symposium 2007 Siófok, Hungary
 10. **Böddi, K.**, Jámbo, É., Németh, V., Szabó, Z., Márk, L. Paleoproteomical Analysis of Mycobacterial Infected Human Remains by HPLC-MS/MS and MALDI TOF/TOF ISABS Conference n Forencic Genetics and Molecular Antropology 2007 Split, Croatia
 11. Jámbo, É., **Böddi, K.**, Németh, V., Tóth, G., Tóth, Cs., Szabó, Z., Márk, L., MALDI TOF Analysis of an Ancient Bone Cancer ISABS Conference n Forencic Genetics and Molecular Antropology 2007 Split, Croatia
 12. **Böddi, K.**, Szabó, Z., Takátsy, A., Markó, L., Wittmann, I., Ohmacht, R. Enrichment of Amadori Products Derived from the Non-enzimatic Glycation of Human Serum Albumin (HSA) using Microscale Boronate Affinity Chromatography 8th Balaton Symposium 2009 Siófok, Hungary
 13. **Böddi, K.**, Brochmann, A.S., Szalma, J., Lempel, E., Szabó, Z., Takátsy A., Protein Identification from Submandibular Salivary Stones with MALDI TOF Mass Spectrometry 28th Informal Meeting on Mass Spectrometry 2010 Kőszeg, Hungary