



Pannon Egyetem
Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskola

**ÚJFAJTA CUKOR ELVÁLASZTÁSI ÉS
MEGHATÁROZÁSI MÓDSZER
KIFEJLESZTÉSE KAPILLÁRIS
ELEKTROFORÉZISRE**

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Készítette:

Farsang Róbert
okleveles környezetmérnök

Témavezetők:

Dr. Guttman András, Dsc.
Professor emeritus

Dr. Járvás Gábor
Tudományos főmunkatárs

2025

Bevezetés és célkitűzés

A fehérjékhez kötött összetett cukrok (glikánok) minőségi és mennyiségi vizsgálata egyre nagyobb szerepet játszik egyes betegségek diagnosztizálásában, valamint fehérjealapú gyógyszerek minőségi állandóságának monitorozásában. Ezek a cukorstruktúrák számos élettani folyamatban játszanak kulcsszerepet, részt vesznek például immunfolyamatokban, jelátvitelben, a fehérjék stabilitásának és oldatosságának kialakításában. Egyes betegségekben, többek között a rák és autoimmun betegségek esetén az egyes fehérjékhez kötött cukorstruktúrák mennyiségi aránya megváltozik, így azok biomarkerként használhatóak. Ahhoz, hogy a glikán struktúrák külön-külön vizsgálhatóak legyenek, legtöbbször valamilyen elválasztási módszert használnak, például nagyteljesítményű folyadékkromatográfiát, vagy kapilláris elektroforézist. Az utóbbi egy világszerte egyre gyakrabban alkalmazott módszer, viszonylag új technika a folyadékkromatográfiához képest, vele ortogonális, mindkettőnek megvannak az előnyei és hátrányai. A kapilláris elektroforézissel történő glikán analitika fejlesztésében még rengeteg potenciál van, emellett a glikánok betegségeknel betöltött szerepének kutatása még gyerekcipőben jár. A kapilláris gélelektroforézis alapú glikán analízis mintaelőkészítése tartalmaz egy lépést, amely során a szabad, el nem reagált fluoreszcens festéket eltávolítják. Ez meglehetősen erőforrásigényes feladat, így ennek kiküszöbölése jelentősen könnyítené a kapilláris elektroforézissel történő glikán analízis folyamatát.

Munkám során olyan kapilláris elektroforézis alapú glikán elválasztási rendszert terveztem kialakítani, amely az elektroosmotikus áramlás (EOF) jelenséget hasznosítja on-line tisztítás megvalósítására. Ez úgy lehetséges, hogy az EOF az elválasztókapillárisban a kimeneti vég felé mozog, amihez képest a szabad festék és a festett cukrok relatív mozgása ellentétes irányú. Amíg a szabad festék abszolút értékben vett mozgékonyasága nagyobb, mint az EOF sebessége (így a hidrodinamikusan injektált festék távozik a kapillárisból annak bemeneti végén), addig ez a jelölt cukrok esetében kisebb, így azok a detektor felé mozognak, miközben elválnak az egymáshoz képest a nem egyforma mozgékonyaságuk miatt. Az ilyen elválasztási rendszer esetén nincs szükség a tisztítási lépésre.

Emellett a kialakított újfajta elválasztási rendszerrel terveztem tesztelni a mágneses mikrógyöngyökkel végzett mintatisztítási módszer hatékonyságát, illetve az elválasztási módszerhez szerkezetmeghatározást lehetővé tevő számítási algoritmust terveztem kifejleszteni, ami kellően nagy pontossággal és reprodukálhatósággal képes az elválasztott molekulák struktúráját meghatározni a kapilláris hosszától függetlenül.

Kísérleti munka

Kutatómunkám során egy olyan újfajta, fluoreszcensen jelölt glikánok elválasztására szolgáló kapilláris elektroforézis módszert kidolgoztam ki, amely esetén elhagyható a szabad festék eltávolítását célzó mintaelőkészítési lépés. Ehhez egy olyan pufferrendszert alakítottam ki, amely az elektroosmotikus áramlást használja az elválasztás során. A pufferkoncentrációt, a pH-t, és egyéb paramétereket úgy állítottam be, hogy a kapilláris kimeneti vége felé áramló EOF sebessége a jelölt glikánok és a szabad festék abszolútértékben vett (egyébként negatív előjelű) effektív mobilitásértékei közé essen, így a szabad festék az elválasztás kezdetén a kapilláris bemeneti részén elhagyja a rendszert, míg a jelölt glikánok – azok pozitív irányú látszólagos mobilitásaik miatt – detektálhatóak. A kialakított pufferösszetétel 253 mM Tris-bázis, 150 mM kapronsav, pH=8,1 lett. A kialakított rendszerrel ezenkívül megvalósítottam egy nagytérfogatú mintafelhalmozáson (LVSS) alapuló prekoncentrációs módszert, amivel egy nagyságrendnyi intenzitás növekedést értem el.

A létrehozott újfajta elválasztási módszert ezután felhasználtam arra, hogy vizsgáljam az iparban használt paramágneses mikroyöngyökkel végzett mintatisztítási eljárás hatékonyságát. Megállapítottam, hogy különböző minták esetén (maltodextrin létra, humán immunoglobulin G, ribonukleáz b és fetuin glikánminták) a tisztítási lépés szignifikáns változást eredményezett egyes glikánstruktúrák mennyiségében, ami kritikus hibát okozhat a glikánprofil kiértékelése során, ugyanis a struktúrák mennyiségi arányaiból nyerhető információ torzul.

Továbbá az EOF alapú kapilláris elektroforézis módszerhez megalkottam egy Glükóz Egységen (GU) alapuló szerkezetmeghatározási módszert, amely a maltodextrin létrát veszi alapul. A módszer két belső standardot használ, amely két struktúra (maltotrióz (DP3) és maltodekapentaóz (DP15)) megtalálható a maltodextrin létrában is. A módszer robusztusságát 6 napon keresztül, napi 6 alkalommal mért humán immunoglobulin G glikánminta 8 véletlenszerűen kiválasztott struktúrájának GU számításával végeztem, amely esetén a szórás %RSD > 0,1% volt. A módszer reprodukálhatóságát 3 különböző hosszúságú kapillárison végeztem ugyanezzel a mintával, triplikát mérésekkel, amelyek esetében a 8 glikánstruktúrára átlagosan szintén %RSD > 0,1% szórásértéket kaptam, amely rendkívül jónak mondható.

Új tudományos eredmények, tézisek

1. Online elektrokinetikus tisztítást megvalósító kapilláris elektroforézis módszert dolgoztam ki APTS-jelölt glikánok nagy felbontású elválasztására, amely alkalmas olyan minták vizsgálatára, amelyek mintamátrixából előzőleg nem lett eltávolítva a nagy feleslegben adott fluoreszcens festék. Optimalizáltam az elválasztó háttér elektrolit összetételét és pH-ját, valamint az elválasztási paramétereket, majd bizonyítottam, hogy az iparban jelenleg használatos, tisztítási lépést kívánó kapilláris gélelektroforézis módszerhez összemérhető felbontást értem el a 253 mM Trisz-(hidroximetil)-aminometán - 150 mM kapronsav, pH=8,1 pufferrendszerrel felesleges festéktől meg nem tisztított minták esetén, emellett egy speciális, fókuszálással egybekötött nagy térfogatú mintafelhalmozással elődúsítást valósítottam meg, amellyel akár egy nagyságrendnyi jelintenzitás növekedés érhető el.
2. A kifejlesztett kapilláris elektroforézis módszerrel igazoltam, hogy karboxilcsoportokat tartalmazó mágneses gyöngyökkel történő, az iparban alkalmazott mintatisztítási folyamat során bizonyos glikánstruktúrák mennyiségi aránya megváltozhat, ezáltal a minőségi információ torzulhat. A mintakomponensek arányát megvizsgáltam fetuin, humán immunglobulin G, ribonukleáz B, valamint maltodextrin létra tisztított, tisztítatlan, valamint a tisztítási lépés három eluensében, és bizonyítottam az csúcsarányváltozást.
3. Újfajta megközelítéssel, numerikus módszert alkalmazó Glükóz Egység számítási módszert hoztam létre a kifejlesztett kapilláris elektroforézis technikára, ami a maltodextrin létra polimerizációs fokához viszonyítja az ismeretlen glikánstruktúrák effektív migrációs idejét, ami alapján rendkívül nagy pontossággal és ismételhetőséggel, kapilláris hossz és minta vezetőképességtől függetlenül lehetséges azonosítani az analitokat. Hat napon keresztül napi hat humán immunoglobulin G N-glikánprofillal végzett vizsgálattal bizonyítottam az algoritmus ismételhetőségét, valamint 40 cm, 50 cm és 60 cm teljes hosszúságú kapillárison történő 3-3 méréssel bizonyítottam a számítási módszer jó reprodukálhatóságát a kapillárisoszlop hosszától függetlenül.

Tézisek alapjául szolgáló cikkek:

Szabadalom

Farsang, R., Jarvas, G., & Guttman, A. Method for purification free capillary electrophoresis of labeled carbohydrates; WO2025078849

Farsang, R., Jarvas, G., & Guttman, A. Glucose unit determination based on a numeric virtual eof marker search method; WO2025141293A1

Tudományos cikkek

Farsang, R., Hogyor, K., Jarvas, G., & Guttman, A. (2023). Capillary zone electrophoresis of 8-aminopyrene-1, 3, 6-trisulfonic acid labeled carbohydrates with online electrokinetic sample cleanup. *Analytical Chemistry*, 95(45), 16459-16464.

Farsang, R., Jarvas, G., & Guttman, A. (2024). Purification free N-glycan analysis by capillary zone electrophoresis: Hunt for the lost glycans. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 238, 115812.

Farsang, R., Farkas, A., Jarvas, G., & Guttman, A. (2024). Glucose unit computation in capillary zone electrophoresis of carbohydrates using a numerical approximation based search for a virtual EOF marker. A tutorial. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 176, 117762.

Egyéb a dolgozat témájához kapcsolódó publikációk:

Szabadalom

Kovács, N., **Farsang, R.**, Szigeti, M., Jarvas, G., & Jankovics, H.; Tagged exoglycosidase enzymes and immobilized glycan sequencing approach; US20240417708A1

Tudományos cikkek

Farsang, R., Kovacs, Z., Jarvas, G., & Guttman, A. (2022). Ultrahigh-sensitivity capillary electrophoresis analysis of trace amounts of nitrate and nitrite in environmental water samples. *Separations*, 9(11), 333.

Kovács, N., **Farsang, R.**, Szigeti, M., Vonderviszt, F., & Jankovics, H. (2022). Enhanced recombinant protein production of soluble, highly active and immobilizable PNGase F. *Molecular Biotechnology*, 64(8), 914-918.

Filep, C., Szigeti, M., **Farsang, R.**, Habegger, M., Reusch, D., & Guttman, A. (2021). Multilevel capillary gel electrophoresis characterization of new antibody modalities. *Analytica Chimica Acta*, 1166, 338492.

Szabo, M., Sarkozy, D., Szigeti, M., **Farsang, R.**, Kardos, Z., Kozma, A., ... & Guttman, A. (2022). Introduction of a capillary gel electrophoresis-based workflow for biotherapeutics characterization: size, charge, and N-glycosylation variant analysis of bamlanivimab, an anti-SARS-CoV-2 product. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10, 839374.

Farsang, R., Kovács, N., Szigeti, M., Jankovics, H., Vonderviszt, F., & Guttman, A. (2022). Immobilized exoglycosidase matrix mediated solid phase glycan sequencing. *Analytica Chimica Acta*, 1215, 339906.

Sarkozy, D., **Farsang, R.**, Szigeti, M., Austin, S., Lock, S., & Guttman, A. (2023). Capillary electrophoresis analysis of industrial galactooligosaccharides. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 233, 115434.

Torok, R., Auer, F., **Farsang, R.**, Jona, E., Jarvas, G., & Guttman, A. (2022). The effect of sample glucose content on PNGase F-mediated N-glycan release analyzed by capillary electrophoresis. *Molecules*, 27(23), 8192.