



Pannon Egyetem

Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskola

**Analitikai módszerfejlesztés az N-glikánok  
kapilláris elektroforézissel történő  
elválasztásához**

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Készítette:

Szigeti Márton Géza

Biomérnök B.Sc., Környezetmérnök M.Sc.

Témavezető:

Dr. Guttman András

Egyetemi tanár

2025



## **Bevezetés és célkitűzés**

A glikoziláció az egyik legmeghatározóbb poszttranszlációs módosítás, mely kiemelkedő szerepet játszik a glikoproteinek szerkezetének, stabilitásának és biológiai aktivitásának meghatározásában. Az N-glikánok szerkezeti és mennyiségi analízise nem csupán a biotechnológiai ipar számára bír stratégiai jelentőséggel, hanem a biomarkerek kutatása és a terápiás fehérjék karakterizálása szempontjából is kulcsfontosságú. A jelen doktori disszertáció célja olyan új és megbízható analitikai módszerek fejlesztése volt, melyek lehetővé tették az N-glikánok gyors és hatékony vizsgálatát kapilláris elektroforézis (CE) technikával, különös tekintettel a nehezen hozzáférhető, vagy mesterségesen módosított glikoproteinek esetén. A kutatás során négy fő fejlesztési irányvonal került meghatározásra, melyek egymásra épülve járultak hozzá egy széles spektrumon alkalmazható analitikai módszeregyüttes kialakításához. Elsőként egy tripszines előemésztésen alapuló protokoll került kidolgozásra, amely alkalmas a mesterséges, gliko-módosított fehérjéken gyakran előforduló sztérikus gátlások hatásának csökkentésére. A tripszines előkezelés révén a glikozilációs helyek hozzáférhető válnak az enzim számára a glikán profil minőségi, vagy mennyiségi változásai nélkül. A második fejlesztési lépcsőben egy hőmérsékletgradiens alapú denaturációs protokoll került kidolgozásra, amely hatékonyan csökkentette a fehérjekoncentráció növelése során fellépő precipitációs hatást. A kapilláris elektroforézisre, és különösen a CE-MS kapcsolt rendszerekre jellemző rossz ionizációs hatásfok megköveteli a nagy koncentrációjú, mégis oldott állapotban lévő fehérjemintákat. A detergens koncentrációk optimalizálása, valamint a fokozatos hőmérséklet emelés lehetővé tette a denaturációs folyamat hatékonyságának növelését anélkül, hogy az oldhatósági problémák lépnének fel. A hőmérséklet gradienssel történő denaturálási lépést kiegészítve egy mágneses mikrorészecskéken alapuló mintaelőkészítési eljárás került kifejlesztésre, mely specifikus amin-funkciós csoportokon keresztül kötötte meg a glikoproteineket. Ez a célzott immobilizáció nemcsak tovább növelte a denaturáció hatékonyságát precipitáció nélkül, hanem lehetőséget adott a minta mátrixából származó, analitikai szempontból interferáló komponensek – pl. glükóz – szelektív eltávolítására. A leemésztett és fluoreszcensen jelölt N-glikán struktúrák pontos minőségi meghatározása céljából a minta exoglikozidáz enzimekkel történő szekvenálásának automatizálására került sor. Az egyes lépések optimalizálásával – többek között az enzimek együttes alkalmazásával és az emésztési körülmények finomhangolásával – az analitikai mérés teljes időigénye egy órán



belülre csökkenthetővé vált. A dolgozatban bemutatott módszerfejlesztések nagy mértékben hozzájárulhatnak a glikán alapú analitika fejlődéséhez, különösen a mintakezelés automatizálása, valamint a nagy áteresztőképességű rendszerekhez való illeszkedés és a kis mintamennyiségek vizsgálhatósága terén, mely kidolgozott módszerek potenciálisan integrálhatók gyógyszergyártási környezetbe is.

## **Kísérleti munka**

A doktori kutatómunka során végzett vizsgálatokhoz különböző rekombináns és terápiás fehérjéket (pl. Humira, Enbrel), biológiai mintákat (humán szérum), és referencia standardokat (úgy, mint hIgG1) használtam, melyek glikozilációs mintázata reprezentatívnak tekinthetőek a gyógyszeriparban alkalmazott glikoproteinek körében. A mintaelőkészítési folyamat négy fő lépésből állt: denaturálás, enzimes N-glikán felszabadítás, fluoreszcens jelölés, valamint a felesleges jelölőanyag eltávolítása. A denaturációs lépés célja a fehérjék natív szerkezetének felnyitása, mely hozzáférhetővé teszi a PNGase F enzim számára az aszparaginhoz kötött cukor struktúrákat. A folyamat során különböző detergens kombinációkat (pl. SDS, NP-40) és hőmérsékletgradiens alapú denaturálást használtam ( $30^{\circ}\text{C} \rightarrow 80^{\circ}\text{C}$ ), mely lehetővé tette a fehérjestruktúrák kíméletes, mégis hatékony kitekeredését, minimalizálva a fellépő precipitációs hatást, amely különösen nagy fehérje koncentrációk esetén volt jelentős. Az N-glikánok specifikus eltávolításához Peptide-N-glycosidase F (PNGase F) enzimet használtam. A sztérikus gátlás csökkentése érdekében a fehérjéket tripszines előemésztésnek vettem alá. Ez a módszer jelentősen megnövelte a PNGase F hatékonyságát, különösen a fúziós-, vagy gliko-módosított fehérjék esetében. A felszabadított glikánokat ezt követően 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsav (APTS) fluoreszcens festék alkalmazásával jelöltem meg, mely nagy érzékenységgű lézer indukált fluoreszcens detektálást (LIF) tett lehetővé a kapilláris elektroforézissel történő minta analízis során. A jelölést követően mágneses mikrorészecskéket alkalmaztam a felesleges jelölőanyag eltávolítására. Az N-glikánok szerkezetének minőségi meghatározása – szekvenálása exoglikozidáz enzimek segítségével történt, amelyek szelektíven hasítják le a glikán oldallánc monoszacharidjait. Az enzimes reakciókat azok paramétereinek optimalizálásával, valamint a kapilláris elektroforézis berendezés újszerű alkalmazásával a szekvenálás automatizálhatóvá vált, így az analízis teljes időtartama egy órán belülre volt csökkenthető.



## Új tudományos eredmények, tézisek

1) Biológikumok fejlesztése és gyártása során létrehozott fúziós (fusion) és gliko-módosított (glycoengineered) glikoproteinek N-glikán analízise céljából egy triszpszines előemésztést alkalmazó mintaelőkészítési módszert dolgoztam ki, mely a PNGase F enzimmel történő deglikoziláció során fellépő sztérikus gátlást megszünteti, ezáltal nagy hatékonyságú és reprezentatív N-glikán analízis hajtható végre. A glikoproteinek hatékony denaturálása ellenére is a mesterségesen létrehozott fehérjék esetén az N-glikán struktúrák hozzáférhetősége a PNGase F enzim számára számos esetben korlátozott lehet, mely jelentősen megnöveli az enzimátikus reakció idejét, vagy teljesen hozzá nem férhetővé teszi az enzimet a glikánok számára. A tripszin enzimet alkalmazva ez a sztérikus gátlás megszüntethető anélkül, hogy az N-glikán profilt módosítanánk, így reprezentatív mennyiségi és minőségi analízis végezhető el.

2) A fehérjék denaturációjakor – tulajdonságaiktól függően, első sorban a koncentráció növelésekor – fellépő precipitációs hatás csökkentés céljából egy hőmérséklet gradiens denaturációs módszert dolgoztam ki, melynek segítségével jelentősen megnövelhető a fehérjék koncentrációja a mintában, így a kis mennyiségben jelen lévő fehérjék is detektálhatóvá válnak, valamint különleges analitikai módszerek alkalmazása esetén (tömegspektrometria) a koncentráció növelés megvalósíthatóvá válik. A fehérjék koncentrációjának növelése azok precipitációja miatt korlátozott mértékben hajtható végre, azonban, ha az alkalmazott detergensnek mennyiségét és minőségét optimalizáljuk, és a hőmérséklet fokozatos emelésével elősegítjük a reakció hatékony végbemenetelét, jelentősen megnövelhető a mintában a fehérjék mennyisége célzott analitikai munkák elvégzése céljából.

3) A célzott analitikai mérésekhez szükséges fehérjekoncentráció további növelése céljából egy mágneses mikrorészecskéket tartalmazó mintaelőkészítési módszert dolgoztam ki a denaturációs lépés elősegítése céljából, mely amin-funkciós csoportokon keresztül specifikusan megkötö a glikoproteineket, elősegíti a kapcsolódó reakciókat (PNGase F emésztés) a nem kívánatos mintamátrix komponensek eltávolításán keresztül (glükóz – inhibíció), továbbá szignifikánsan megnöveli a precipitáció nélkül denaturálható fehérje mennyiségét. A funkcionális mágneses mikrorészecskék alkalmazásával jelentősen megnövelhető volt a precipitáció nélkül denaturálható fehérjék mennyisége, továbbá a célzott immobilizációt kihasználva a nem kívánatos minta mátrix komponensek is eltávolíthatóak a rendszerből.





Filep, Csenge; **Szigeti, Marton**; Farsang, Robert; Habberger, Markus; Reusch, Dietmar; Guttman, Andras; Multilevel capillary gel electrophoresis characterization of new antibody modalities, ANALYTICA CHIMICA ACTA 1166 Paper: 338492 (2021)  
Közlemény:32018177 Folyóiratcikk (Szakcikk) Tudományos Nyilvános idéző összesen: 17 | Független: 12 | Független: 5 | Nem jelölt: 0 | WoS jelölt: 16 | Scopus jelölt: 17 | WoS/Scopus jelölt: 17 | DOI jelölt: 17 , Folyóirat szakterülete: Scopus - Analytical Chemistry SJR indikátor: Q1, IF: 6.911

### Tudományometriai mutatók

Külföldi folyóiratban megjelent publikációk száma:	41
Hazai folyóiratban megjelent publikációk száma:	3
Összegzett impakt faktor (várható):	176,0 (15,2)
Összes impakt faktor:	191,2
Első szerzős impakt faktor:	27,7
D1 folyóiratban megjelent közlemények száma:	12
Q1 folyóiratban megjelent közlemények száma:	15
Hivatkozások száma – független / összes:	597 / 860
Összes hivatkozás száma:	860
Hirsch-index; független (összes):	15 (18)