



Pannon Egyetem  
Vegyészmérnöki- és Anyagtudományok Doktori Iskola

**Új analitikai megközelítések terápiás  
fehérjék elválasztásában és fluoreszcens  
jelölésében nátrium dodecil szulfát kapilláris  
gélelektroforézis során**

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Készítette:

Auer Felícia  
okleveles biológus

Témavezető:

Dr. Guttman András  
Egyetemi tanár

2024

## Bevezetés és célkitűzés

Az elmúlt években a biológiai gyógyszerkészítmények egyre fontosabb szerepet képviselnek, mivel specifikus hatásuk révén kevesebb mellékhatást okoznak. A terápiás fehérjék komplex karakterizálása szükségessé teszi az analitikai módszerek fejlesztését. A kapillaris elektroforézist széles körben alkalmazzák a fehérjék tisztaságának vizsgálatára és szerkezeti eltéréseik kimutatására, különösen a kapillaris gélelektroforézis (CGE) módszerét, amely nagyhatékonyságú elválasztást biztosít. Kutatásom célja olyan módszerek kidolgozása volt, amelyek gyorsítják és egyszerűsítik a terápiás fehérjék elválasztását és fluoreszcens jelölését, így csökkentve a költségeket.

Kutatócsoportunk szoros együttműködésben dolgozik a Pannon Egyetem Bio-Nanorendszerek Kutatólaboratóriumával, ahol módszert dolgoztak ki egy glikozilált fehérjék analízise során is fontos endoglikozidáz enzim (6His-PNGaseF) nagyhozamú előállítására. Emiatt céljaim között szerepelt ennek az enzimnek a forgalomban is kapható enzimmel történő összehasonlítása, és az optimális emésztési idő meghatározása, valamint a minta glükóztartalmának, mint enzim aktivitást befolyásoló tényező hatásának vizsgálata. Kutatómunkám során tetrahidroxiboráttal térhálósított dextrans tartalmú mátrixokat alkalmaztam elválasztó közegként, és célul tűztem ki, hogy megvizsgáljam az ultrahíj és nulla (1,00%-0,00%) dextrans tartalmú mátrixok esetében az SDS-fehérje komplexek elválasztási mechanizmusát, nagy hangsúlyt fektetve egy terápiás monoklonális antitest (daratumumab) és alegységeinek elválasztására. További célul tűztem ki egy új típusú elválasztás közbeni (in-migráció) fluoreszcens jelölési módszer bevezetését propidium-jodid (PI) alkalmazásával SDS-CGE esetében. A dolgozat célja bemutatni az új jelölési módszer alkalmazhatóságát terápiás fehérjék analízisének és megvizsgálni a propidium ligand hatását az SDS-fehérje komplexek elektromigrációjára, illetve az elválasztás hatékonyságára.

## Kísérleti munka

Kutatásaim során az N-glikán felszabadulás kinetikáját vizsgáltam a 6His-PNGaseF enzim emésztése során, és az optimális emésztési idő meghatározásához SDS-CGE módszerrel kvantifikáltam a termékeket. Megvizsgáltam a glükóztartalom hatását az enzim aktivitására, és összehasonlító kinetikai vizsgálatot végeztem a 6His-PNGaseF és egy kereskedelmi PNGaseF között. Eredményeim szerint 1 mg/mL glükóz jelenléte aktiválta a 6His-PNGaseF enzimet, míg a kereskedelmi termék aktivitására nem volt hatással. A cIEF elválasztások során enyhe töltésbeli különbségeket figyeltem meg, amelyek valószínűleg befolyásolták az enzimaktivitás glükóz által közvetített változásait.

További munkámban ultrahíg dextrans tartalmú mátrixok alkalmazhatóságát vizsgáltam tetrahydroxiboráttal térhálósított dextrans gélek esetében, amelyeket SDS-CGE ipari standardként használnak fehérje elválasztásra. Eltéréseket figyeltem meg a fehérje standard keverék és a terápiás monoklonális antitest (mAb) intakt formája, valamint alegységeinek méret szerinti elválasztásában. Az elválasztási mechanizmusok megértéséhez Ferguson- és reptációs diagramokat készítettem, amelyek lineáris viselkedést mutattak csökkentett dextrans koncentrációknál. A fehérje standard és az antitest intakt és alegység formáinak felbontása közötti különbségek az alakszelektivitás fontosságára utaltak, hisz a terápiás antitest SDS-sel fedett intakt, valamint könnyű- és nehézláncú alegységei még nulla dextranskoncentráció mellett is megfelelően elkülönültek.

A bioterápiás fehérjék számának növekedése szükségessé teszi az SDS-fehérjék nagy áteresztőképességű analízisét gélelektroforézissel. Ennek érdekében kifejlesztettem egy kapillárison belüli fluoreszcens jelölési módszert propidium-jodid (PI) alkalmazásával, amely elkerüli a költséges kémiai derivatizációt. Az új módszer lehetővé teszi az SDS-fehérjék in situ jelölését és hatékony detektálását, amit fehérje standardokkal és terápiás monoklonális antitestekkel validáltam. A módszer érzékenysége és pontossága a PI koncentrációjának változtatásával optimalizálható.

## **Új tudományos eredmények, tézisek**

- 1. Tézis: A Pannon Egyetem Bio-Nanorendszerek Kutatólaboratórium által gyártott 6His-PNGaseF enzim emésztési idejének optimalálása során megállapítottam, hogy a glükóz jelenléte növeli az enzimátikus emésztési folyamat hatékonyságát.**

A terápiás fehérjék minőségi ellenőrzésekor fontos lépés a glikoproteinekhez kötött N-glikánok jellemzése is. A legtöbb esetben ezeket az oligoszacharid struktúrákat egy endoglikozidáz enzimmel, PNGaseF alkalmazásával szabadítják fel. Munkám során egy egyetemen belül gyártott 6His-PNGaseF enzim deglikozilációs kinetikáját vizsgáltam az optimális emésztési idő meghatározásához, valamint a minta glükóz tartalmának hatását vizsgáltam, mint potenciális endoglikozidáz aktivitást módosító tényezőt. Az enzim aktivitást a Michaelis-Menten modell segítségével vizsgáltam és összevettem egy kereskedelmi forgalomban kapható és széles körben alkalmazott PNGaseF enzim aktivitásával.

- 2. Tézis: Híg és ultra-híg dextrán tartalmú gélek alkalmazásának lehetősége SDS-CGE módszer esetében**

Munkám során a szakirodalomban először vizsgáltam a híg és ultra-híg (1%-0,01%) valamint nulla dextrán koncentrációjú elválasztó pufferrendszerek hatását egy fehérje standard keverék és egy terápiás fehérje alegységeinek SDS-CGE elválasztása esetében, valamint tanulmányoztam a szeparációs mechanizmusokat. A híg és ultrahíg polimeroldatok gyors elválasztási időket biztosítanak a terápiás fehérjék analízisének mely rendkívül előnyös lehet a fejlesztés és gyártás során.

- 3. Tézis: Elválasztási mechanizmus vizsgálata a híg és ultrahíg dextrán-borát mátrixokban**

A Ferguson diagramok a fehérje standard és a terápiás mAb minták esetében lineáris karakterisztikát mutattak, annak ellenére, hogy híg polimer oldatokban nem várható a retikuláció kialakulása. A fehérje standard és terápiás fehérje mintakomponensek közötti felbontásbeli különbségek az alakszelektivitás fontosságára utaltak. Az SDS-fehérje komplexek az elektromigráció során a véletlenszerűen eloszló dextránláncokba való ütközése a kisebb méretű fehérjék esetében billegést a nagyobbak esetében pedig kötélyszerű függést eredményez, ami egyfajta méretalapú elválasztást eredményezett.

- 4. Tézis: A propidium-jodid, mint fluoreszcens festék alkalmazása terápiás fehérjék vizsgálatakor**

Munkám során bevezettem az SDS-fehérje komplexek elválasztás közbeni (in-migráció) fluoreszcens jelölésének koncepcióját propidium-jodid alkalmazásával, melyet korábban csak

nukleinsavak jelölésére használtak. A módszerrel egyszerűen elvégezhető az *in situ* jelölés az elválasztás során, mely így nem igényel sem elválasztás előtti vagy utáni derivatizálási lépést, jelentősen felgyorsítva és megkönnyítve ezáltal a jelölés munkafolyamatát.

## **Tézisek alapjául szolgáló cikkek:**

### **Szabadalom**

**Felicia Auer**, András Guttman: Módszer az SDS-fehérjék nem kovalens migrációs fluorofór címkézésére,ellenáramú elektromigrációt használva SDS-CGE során Bejelentés napja: 2023. 12. 22.

### **Tudományos cikkek**

**Felicia Auer**, Andras Guttman: *In Migratio* Noncovalent Fluorophore Labeling of Proteins by Propidium Iodide in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis, *Analytical Chemistry* 27, (2024), 10969–10977 DOI: 10.1021/acs.analchem.4c01371

**Felicia Auer**, Andras Guttman: Size separation of sodium dodecyl sulfate–proteins by capillary electrophoresis in dilute and ultra-dilute dextran solutions, *Electrophoresis* 19-20, (2023), 1607-1614, DOI: 10.1002/elps.202300067

Rebeka Torok, **Felicia Auer**, Robert Farsang, Eszter Jona, Gabor Jarvas, Andras Guttman: The Effect of Sample Glucose Content on PNGase F-Mediated N-Glycan Release Analyzed by Capillary Electrophoresis, *Molecules* 23, (2022), 8192. DOI: 10.3390/molecules27238192

## **Egyéb a dolgozat témájához kapcsolódó publikációk:**

Balázs Gyebrovski, András Ács, Dániel Szabó, **Felicia Auer**, Soma Novozánszki, Bernadette Rojkovich, Anna Magyar , Ferenc Hudecz , Károly Vékey, László Drahos, Gabriella SármayThe Role of IgG Fc Region N-Glycosylation in the Pathomechanism of Rheumatoid Arthritis *International Journal of Molecular Sciences* 10 (2022),5828, DOI: 10.3390/ijms23105828

**Felicia Auer**, Gabor Jarvas, Andras Guttman: Recent advances in the analysis of human milk oligosaccharides by liquid phase separation methods, *Journal of Chromatography B* 1162, (2021),122497, DOI: 10.1016/j.jchromb.2020.122497