

## **Opponensi vélemény Szigeti Márton Géza; „Analitikai módszerfejlesztés az N-glikánok kapilláris elektroforézissel történő elválasztásához” című egyetemi doktori (Ph.D.) értekezéséről**

Szigeti Márton Géza doktorandusz hallgató kutató munkáját a Pannon Egyetem, Mérnöki Kar Bio - nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet Transzlációs Glikomika Kutatócsoportjában (Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratórium – Veszprém Laboratórium (Horváth Csaba Memorial Laboratory of Bioseparation Sciences – Veszprém Laboratory)), Veszprémben végezte Prof. Dr. Guttman András irányításával a Kémiai és Környezettudományok Doktori Iskola, Kémiai tudományok doktori programjában.

A munkacsoport alapvető célja a glikomikában használt bioanalitikai módszerek fejlesztése, bővítése és alkalmazások kiterjesztése az orvos- és az élettudomány területére. Ezek a fejlesztések kiterjednek a mintaelőkészítésre, a kapilláris elektroforézis alapú elválasztástechnikai módszerekre, illetve a kapcsolódó műszer és bioinformatikai fejlesztésekre, beleértve a szoftverfejlesztéseket is.

A doktorjelölt választott témája nagyon aktuális, tudományterületén egyedi, hosszú távon a gyógyszeripari kapcsoltsága miatt társadalmilag jelentős. Kutatása során olyan analitikai módszerek fejlesztése volt a cél, amelyek lehetővé teszik a glikozilált fehérjékhez kötött N-glikánok gyors, megbízható és reprezentatív vizsgálatát kapilláris elektroforézis (CE) technikával. A munka során több olyan mintaelőkészítési stratégiát dolgozott ki, amely jelentősen javíthatja és gyorsíthatja a makromolekulák kapilláris elektroforézis alapú glikán térképezését.

A jelölt értekezése 79 arab és 14 római számmal ellátott oldal terjedelemben, a melléklettel együtt 20 táblázatot és 32 ábrát tartalmazva, hagyományos szerkezetben, magyar nyelven íródott.

A disszertáció a „Tartalomjegyzéket” követően magyar, angol és német nyelvű összefoglalókkal („Kivonat”, „Abstract”, „Abstrakt”) indul el, amelyek a szakmai és nyelvi szempontoknak megfelelnek. Az „Új tudományos Eredmények – a doktori értekezés tézisei” rész négy pontban, tömören, átláthatóan és világosan foglalja össze a kitűzött célokat és problémákat, illetve a kapcsolódó eredményeket és megoldásokat.

A téziseket a „A doktori értekezéshez kapcsolódó publikációk jegyzéke” és a „A doktori értekezéstől függetlenül megjelent publikációk jegyzéke”, az „Alkalmazott rövidítések” jegyzéke majd a „Nyilatkozat” és a „Köszönetnyilvánítás” követi.

A „Irodalmi áttekintés” egy szerkezetileg jól felépített, nagyon részletes bemutatása a témának, felkelti a kíváncsiságot. Az áttekintés során képet kapunk a teljes témakörrel kezdve a glikozilációval, mint ko- és poszttranszlációs módosítással; annak biológiai szerepével, folytatva a kapilláris elektroforézissel, mint fontos bioanalitikai módszerrel; egészen a vizsgálni kívánt célfehérjéig, és azok szerepéig – mindezt a szakirodalom nagyon részletes tudományos áttekintésével.

A következő fejezet, a „Célkitűzés”, lényegre törő és világos, felfedi a kutatással megválaszolni kívánt kérdéseket, támaszkodva az ismert eredményekre, felfedve azok „hiányosságait”.

A „Vizsgálati módszerek” fejezet logikusan, a teljes munkafolyamatot követve van felépítve, körültekintően, nagy részletességgel, megfelelően ismerteti a jelölt által használt anyagokat, korszerű, a gyógyszeriparban is napi szinten alkalmazott analitikai vizsgálati módszereket, a célkitűzésben megfogalmazott pontok szerint haladva.

A „Vizsgálati eredmények és kiértékelésük” fejezet nagyon részletesen, hosszan és logikusan mutatja be a kapott eredményeket és az elemzések során kapott adatokat, a megfelelő kiértékelések után helytálló következtetések levonva. Kiemelendő, hogy segítve az olvasót, a kulcskérdéseket újra felsorolja, és emellett rávilágít a kapilláris elektroforézishez kapcsolt analitikai munkák nehézségére és kihívásaira is.

A következő, „Összefoglalás” fejezetben a jelölt a kapott eredményeket tömören, érthetően és kellő önkritikával értékeli ki.

A dolgozat egy 99 hivatkozást tartalmazó, szabályos „Irodalomjegyzék” -et követően az M.1. táblázatot tartalmazó „Melléklettel” zárul.

Általánosságban elmondható, hogy az értekezés arányosan, jó tagolással lett felépítve, jó szakmai stílusban íródott, kevés elütést tartalmazott. Az ábrák és táblázatok egyértelműek, jó elhelyezésűek, feliratozásuk egységes. A dolgozat külső megjelenése megfelelő.

### **A disszertáció legfontosabb tudományos eredményei az alábbiak szerint foglalhatók össze:**

1. A gyógyszeriparban előállított biológiai készítmények analitikai vizsgálatához kapcsolódó glikán analízishez a doktorjelölt egy **új mintaelőkészítési módszert** dolgozott ki. Ez a tripszines előemésztés megszünteti a sztérikus gátlást, javítva a glikán analízis hatékonyságát, a glikán profil megváltozása nélkül.  
A gátló hatás megszűnésével a minőségi és mennyiségi analízis pontosabbá, teljesebbé válik.
2. A célfehérjék glikán analíziséhez történő mintaelőkészítés során fellépő precipitációs hatás elkerülésére a hallgató olyan **új módszert dolgozott ki**, amely segíti a koncentráció megnövelését a fehérjék kicsapódása nélkül.

Ezzel a módszerrel a kisebb mennyiségben jelenlévő célfehérjék analízise is elérhetővé válik.

3. A célfehérjék koncentrációjának további lehetőségét biztosítja a jelölt által **kidolgozott másik mintaelőkészítési módszer**, amely mágneses gyöngyök segítségével – amin funkció csoportokon keresztül – a glikoproteineket specifikusan megköti.

Ezzel a segíti a mintafeldolgozáshoz kapcsolt specifikus enzimreakciókat, valamint a nemkívánatos komponensek eltávolításával a relatív mintakonzentrációt is megnöveli a precipitáció veszélye nélkül.

4. A doktorjelölt munkája során, kialakított egy olyan **szekvenálási munkafolyamatot**, amellyel a glikán analízis akár egy órán belül is elvégezhető.

Ezzel a félautomata módszerrel a mintaelőkészítéshez kapcsolódó különböző enzimatis emésztések jól koordinált módon alkalmazhatók, jelentősen meggyorsítva a gyógyszeriparban is fontos szerepet betöltő glikán analízist. A folyamat megfelelő paraméterezés mellett, a rendelkezésre álló készülék használatával teljesen automatizálható.

#### A dolgozattal kapcsolatos megjegyzések:

A dolgozattal kapcsolatos szerkesztési, nyelvi és stilisztikai megjegyzéseket és javaslatokat a bíráló az előzetes vitához készített bírálatában részletesen összefoglalta. A doktorjelölt a javaslatoknak megfelelően a szükséges kiegészítéseket maradéktalanul megtette és javításokat elkészítette. Így jelen bírálatban erre a pontra részletesen nem térnek ki.

#### Kérdések:

A doktorjelölt az eredményeket két első és egy másod szerzős Q1/D1 besorolású közleményben foglalta össze és ezek összesített impakt faktora több mint 15. Ezen kívül a jelöltnek közel 40 egyéb publikációja jelent meg külföldi folyóiratokban, így az összes közlemény impakt faktora több mint 190. Mindemellett magyar nyelvű folyóiratokban is publikált, valamint eredményeit számtalan tudományos konferencián mutatta be.

Mivel a jelölt tudományos munkája, az ehhez kapcsolódó nagy számú közleménye, eredményeinek nívós folyóiratokban történő előzetes publikációja nagyban segítette a dolgozat maximálisan pozitív megítélését, így a feltett kérdések csupán a személyes kíváncsiságom és érdeklődésem okán születtek meg, azok a dolgozat általam történő értékelésén nem változtatnak.

- A „Vizsgálati eredmények és kiértékelésük” fejezet 4.1. pontjában olvashatunk a glikomódosított (glycoengineered - geAb) fehérje analíziséről. Ezek a fehérjék miben különböznek a konvencionális biológiai készítményektől (szerkezet, előállítás módja, stb.), van esetleg nyilvános / nyilvánosságra hozható információ?
- Ugyanebben a pontban (4.1.) láthatjuk a fehérjék cIEF analízis eredményit (40. oldal). Az eredményeket értékelve milyen különbséget láthatunk a klasszikus ioncserélő

oszlopkromatográfiával összehasonlítva? Történt összehasonlítás a módszerek között? Az eredmények alapján ez a módszer sokkal jobbnak, és gyorsabbnak tűnik.

- A fejezet 4.2. pontjában olvashatunk a glikánanalízis mintaelőkészítéséhez kapcsolható glükóz hatás problémáról (48. oldal). Az eddigi tudományos (és ipari analitikai) méréseket mennyiben befolyásolja, az, hogy idézve a jelöltet: „ csupán marginális utalásokat tett az esetleges jelenségre”. Az eddigi biomarker keresések – ahol a glikoziláció is szóba kerül - nem válhatnak kérdésessé?
- Ugyanebben a pontban, az 53. oldalon olvashatunk arról, hogy a csúcsarányok szignifikánsan nem változnak a módosított mintafeldolgozás során. Ezt melyik ábrán láthatjuk a nem módosított mintafeldolgozáshoz viszonyítva?
- A „Vizsgálati eredmények és kiértékelésük” fejezet utolsó (4.4.) pontjában az „Automatizált N-glikán szekvenálás” részletesen foglalkozik a glikánanalízis ipari szempontból is nagyon fontos gyorsítási és automatizálási lehetőségével, annak eredményeivel. Vannak-e további tervek a továbbfejlesztésre? Van-e már esetleg a piacon hasonló fejlesztés? Van-e esetleg ipari partner részéről érdeklődés?

Összefoglalásként elmondható, hogy Szigeti Márton Géza doktorandusz hallgató egy átfogó kutatás során olyan új módszerfejlesztéseket hajtott végre, amelyek alkalmasak az N-glikán analízishez kapcsolható mintafeldolgozási folyamat javítására, így az analízis hatékonyságának, pontosságának növelésére. Kiemelkedik a glikánanalízis (szekvenálás) munkafolyamatának fejlesztése, amely lehetőséget nyújthat a gyógyszeripari fókuszban lévő biológikumok / bioszimilárisok gyorsabb, automatizálható analízisére.

Az elért eredményeket, nagyon értékes, új tudományos eredményeknek fogadom el.

Mindezek alapján Szigeti Márton Géza értekezését vitára bocsátásra alkalmasnak találom, **elfogadásra javaslom** valamint a későbbi nyilvános vita után a Ph.D. fokozat odaítélését sikeres védés esetén támogatom.

Debrecen, 2025. november 15.



UD-GENOMED Medical Genomic  
Technologies Kft.  
4032 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.  
Tel: +36 (0) 52 513603  
Fax: +36 (0) 52 513604

Dr. Kádás János  
Ügyvezető Igazgató  
UD-GenoMed Kft.

Külső tanácsadó, egyetemi oktató  
DE ÁOK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet