



**Válasz Dr. Mizsey Péter Professzor Emeritus úr
opponensi véleményére**

Doktorjelölt: Szigeti Márton Géza

Doktori disszertáció címe: Analitikai módszerfejlesztés az N-glikánok kapilláris elektroforézissel történő elválasztásához

Témavezető: Dr. Guttman András, D.Sc.

Tisztelt Dr. Mizsey Péter Úr!

Köszönöm az Analitikai módszerfejlesztés az N-glikánok kapilláris elektroforézissel történő elválasztásához címmel írt Ph.D. értekezéssel kapcsolatos írt bírálatát, részletes szakmai véleményét, észrevételeit. A bírálatában megfogalmazott szakmai észrevételek, illetve a műhelyvitán elhangzott javaslatok alapján elvégeztem a szükséges módosításokat, amelyeket a disszertáció végleges változatába beépítettem. Nagyra értékelem a támogató gondolatait és a konstruktív visszajelzéseit. Megfogalmazott kérdéseire azok sorrendjének megfelelően röviden az alábbiakban válaszolok.

1) A hőmérsékletgradiens alapú denaturációs protokollnál mely paraméter volt a legkritikusabb a precipitáció elkerülésében?

A kísérleti eredmények azt bizonyították, hogy önmagában a gradiens módszer alkalmazása mellett már jelentősen növelhető a precipitálódás nélkül denaturálható fehérjék mennyisége, amely a tömegspektrometriás mérésekhez szükséges. Negatív ionizációs mód mellett is megfelelően nagy intenzitású jelet adó jelölt N-glikán koncentráció eléréséhez azonban elengedhetetlen a fehérjék rögzítve történő denaturálása, mely a disszertációmban bemutatott módon nagy hatékonysággal kivitelezhető. Mindezt gyakorlati oldalról vizsgálva fontos megemlíteni, hogy ha kis térfogat tartományon belül is, de szignifikánsan eltérő térfogatok alkalmazása mellett folyik a mintaelőkészítési folyamat, ami, mint faktor határozottan megjelenik, mint kritikus tényező a folyamatban.



2) A Humira fehérje alkalmazása mellett végzett validálási kísérleteknél milyen jellegű glikán struktúráknál mutatkozott a legnagyobb mérési szórás? Az elvégzett kísérletek alapján mely szerkezet típusok a módszer legkritikusabb pontjai?

A 4.8. táblázatban indukált módon a kis koncentrációban megjelenő csúcsok statisztikai elemzése kapcsán jól látható, hogy mind a méréstechnika korlátaiból, mind a kiértékelés bizonytalanságából adódóan a kapott adatok jelentősen terheltek. Ami viszont a gyógyszeripar szempontjából kiemeltté teszi ezt a kérdést az az, hogy ezen struktúrák között megjelennek azok a magas mannóz tartalmú szerkezetek melyek jelentős hatást fejtenek ki a biológimukora adott immunválasz kapcsán, így ezek pontos analízise, habár koncentrációjuk látszólag kicsi, akár elhanyagolható, a módszer valós kritikus pontjait alkotják hatásukból kifolyólag.

3) A gyorsított exoglikozidáz szekvenálási lépésnél milyen kompromisszumot kellett kötni a reakcióidő és az enzim specifitása között, a módszer jelen formájában milyen paraméterek mellett már nem alkalmazható torzítás nélkül?

Az elvégzett kísérletek alapján elmondható, hogy az emésztési idő a legmeghatározóbb paraméter a torzítatlanság biztosítása szempontjából. A szialidáz enzim esetén elmondható, hogy 40°C felett technikailag megszűnik az aktivitása, a galaktozidáz és hexóزامинидáz enzimek esetén a hőmérséklet változtatása egy bizonyos határig befolyásolja a folyamat hatékonyságát, azonban a hőmérséklet optimumok figyelembevételével, a vizsgált fehérjére specifikusan az emésztési idő lesz a teljes folyamatra nézve a kritikus és sebesség meghatározó lépés.

Veszprém, 2025. november 19.

Szigeti Márton Géza
doktorjelölt