

**Válasz Prof. Dr. Klebovich Imrének, a MTA doktorának
a „Korszerű analitikai módszerek alkalmazása a peptid és
fehérjekutatásban” c.,
a MTA doktori értekezésemről írt bírálatára**

Engedjék meg, hogy először is köszönetet mondjak Prof. Dr. Klebovich Imrének, hogy különös odafigyeléssel, nagy gonddal többször is áttanulmányozta doktori értekezésemet. Külön örülök, hogy a Bíráló is hasonlóan látta az utóbbi évtizedek tudományos fejlődését, a multidiszciplinaritás szükségszerűségét és annak is, hogy az értekezésem legkülönbözőbb témaköreiben nem a heterogenitást, hanem a (bizonyos módon) rendszerbe foglalt sokszínűséget vette észre. Öröm számomra, hogy véleménye szerint munkám során egyesíteni tudtam a *“vizsgálatokhoz szükséges biológiai, bioanalitikai fejlesztési és az új vizsgálati módszerek együttes szellemiségét és komplexitását”*. Ez persze nem jelenti azt, hogy a bemutatott biológiai, biokémiai, orvostudományi stb. problémák minden részletét bioanalitikai vonatkozásain túl tökéletesen ismerném.

A Bírálónak az értekezésről formai vonatkozásában két megjegyzése a volt, mely szerint terjedelme meghaladja az ideális nagyságot, ill., hogy néhány fejezet tárgyalása túl részletesnek bizonyult. Az értekezés hosszú idő utáni ismételt elolvasása után nekem is volt ilyen érzésem, ezért a Bíráló mindkét kifogásával egyetértek. Prof. Dr. Kremmer Tibor bírálata is kitér az értekezés terjedelmére, ezért részletesen ott válaszolok rá.

Prof. Dr. Klebovich Imre szakmai Bíráló megjegyzéseire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok:

1. Lucernasejtek homogenizátumának ioncserés kromatográfiával elválasztott frakciói között egyikben ciklinfüggő kináz inhibitor aktivitással rendelkező fehérjét mutattunk ki. A frakció összetételét fordított fázisú LC-MS módszerrel tovább vizsgáltuk (36. ábra) és számos fehérjét találtunk benne. Közülük egyedül az 5,3 percnél eluálódó 8526 Da molekulatömegű fehérjét mutatott ciklinfüggő kináz inhibitor hatást, ezért proteomikai módszerekkel *csak azt az egy fehérjét* azonosítottuk.

A fehérje redukálása, alkilezése majd tripszines hidrolízise után LC-MS módszerrel “peptid tömeg térképezés”-t végeztünk és a SwissProt adatbázisban 72%-os szekvenciafedettséggel (2. táblázat) ubiquitinnek azonosítottuk. A “peptid tömeg térképezés” eredményét két peptid tandem-MS-sel végzett szekvenciameghatározással erősítettük meg.

2. A trifluorecetsav erősen kötődik peptidekhez, ami erősen bázikus peptid vizsgálata esetén megnehezíti annak azonosítását, amint az az intézetünkben előállított VEPKVKKREAVAGRGRGRGRGRGRGRGRGGPRR, 15 bázikus aminosavat tartalmazó peptid ESI-MS spektrumán látható (45A. ábra). A kapilláris elektrokinetikus kromatográfiás tisztítást követő MS spektumban az előállítani kívánt peptid mellett egy szennyezőt is ki lehetett mutatni, amit az 3667,5 molekulatömegű ion 2-9-szeres töltésű ionjainak sorozatával bizonyítottunk (45B. ábra). Egy ábrának (az aláírással együtt) önmagában is elegendő információt kell tartalmaznia a mondanivaló megértéséhez. A pirossal jelzett peptid a főtermék melletti szennyezése volt, így számunkra szükségtelen volt annak szekvenciáját meghatároznunk. A fő- és melléktermékek molekulatömegének különbsége alapján annyi volt megállapítható, hogy a pirossal jelzett peptid egy Lys aminosavval kevesebbet tartalmazó ún. deléciós peptid volt, de pontosabb szerkezetét nem határoztuk meg.

3. A proteomikai fehérjeazonosítás a tömegspektrometriás mérések eredményeinek fehérje és nukleotid adatbázisokban, különböző algoritmusok szerint történő keresésén alapul. Így a fehérjeazonosítás minősége a mérések megbízhatóságán túl függ az algoritmusok típusától és nagy mértékben az adatbázisokban lévő fehérjék számától, ill. adatainak minőségétől. A fehérjeazonosítás jóságának megítélésére az egyes adatbáziskereső programok (MASCOT, ProteinLynx Global Server, Protein Prospector, Spectrum Mill, Phoenix, stb.) más-más értékelő rendszert (scoring) fejlesztettek ki. A proteomika kezdeti szakaszában elterjedten használt "peptid tömeg térképezés" (Peptide Mass Fingerprint, PMF) módszer használatakor a vizsgált fehérjéből proteolitikus hasítással képződött peptidek tömegét hasonlították (hasonlítottuk) össze az adatbázisban szereplő összes fehérje in silico, hasonló paraméterek melletti hasítási peptidfragmenseinek tömegeivel. A tömegek egyezésének foka és a fehérje szekvenciafedettsége voltak az azonosítás megbízhatóságának fő mérőszámai és általában a 10% feletti szekvenciafedettséget vették a megbízható fehérjeazonosítás alsó határának. A szekvenciafedettség kísérleti szempontból függ a fehérje mennyiségétől, aminosavszekvenciájától, gélfestés módjától, az enzim típusától, a tömegspektrométer típusától stb. Ha a PMF mérésekből származó eredményeket több, egymástól eltérő algoritmussal működő keresőprogrammal is megvizsgáljuk, egyezés esetén nő a megbízhatóság. Jelentősen növeli a fehérjeazonosítás jóságát, ha egy-két peptidfragmensnek MS/MS módszerrel meghatározzák a szekvenciáját. Korai proteomikai vizsgálataink során mi is PMF módszert alkalmaztunk fehérjék azonosítására, de az MS adatokat minden esetben két

adatbáziskereső programmal analizáltuk és minden fehérjéből minimum egy peptidnek meghatároztuk a szekvenciáját. Így a 6%-os szekvencialefedettség is elegendő volt a fehérjék nagy biztonsággal történő azonosításához (különösen akkor, ha a meghatározott peptidszekvencia csak egy fehérjétől származható, ún. proteotipikus peptid volt). A nagyobb szekvencia lefedettség nem elsősorban a fehérje azonosításának megbízhatóbbá tétele miatt lehet indokolt, hanem az adott fehérje különböző homológ és alternatív hasítási formáinak, poszttranszlációs és kémiai módosításainak azonosítása miatt. Ezen feladatok azonban kívül estek a munkám célkitűzésein.

A disszertációban szereplő vizsgálatok többségénél a fehérje szekvencialefedettségnek a fehérje-azonosítás megbízhatósága szempontjából kisebb a jelentősége, mivel az azonosítás az enzimatis lebonat során létrejött peptidek MS/MS fragmentációján alapult.

4. A HSP90 egy 90kDa tömegű, ATP-függő molekuláris chaperon (dajkafehérje), melynek fő feladata a sejtek fehérjehomeosztázisának fenntartása, az újonnan képződő fehérjék érett, aktív formájának elősegítése, feltekerése, stabil állapotban tartása, ill. stressz hatására “elromlott” szerkezetű fehérjék helyreállítása. Tumorsejtekben a HSP90 termelődése megnő, támogatva az túltermelő/mutáns/transzlokált onkoproteinek aktivált, metastabil formájának kialakulását és fenntartását, elősegítve ezáltal a sejtek rosszindulatú transzformációját és a daganat növekedését. Azok a kis molekulatömegű természetes és szintetikus molekulák, amelyek erősen kapcsolódnak a HSP90 ATP-kötő helyeihez (HSP90 inhibítorok), megváltoztatják azok konformációját és a HSP90 “folding” képességének gátlásán keresztül csökkentik a daganatsejt túlélésének, progressziójának esélyét, elősegíti az onkogén fehérjék proteozóma általi lebontását, ezért a HSP90 ideális célpont tumorelles vegyületek fejlesztéséhez (Scaltriti et al., 2012, Travers et al., 2012). Tumorelles hatású, természetes antibiotikumokkal és szintetikus analógjaikkal (geldanamycin, 17-AAG, radidicol, novobiocin, purin, pirazol, triazol származékok stb.) számos klinikai vizsgálat történt, azonban a klinikai gyakorlatban még nincs HSP90 inhibítor daganatos betegségek kezelésére (Neckers et al., 2012).

A daganatsejtek túlélését és burjánzását az onkogén fehérjék segítik elő, melyek hatásukat más fehérjékkel, kofaktorokkal történő kölcsönhatások sorozatában fejtik ki. Ezen kölcsönhatások gátlása, megszüntetése viaszoríthatja a kóros szignalizációs és transzkripciós folyamatokat, újraprogramozhatja a tumoros sejtet normális sejtfunkeiók (mint sejtthalál, differenciálódás és öregedés) végrehajtására. A folyamatokban résztvevő fehérjék felülete komplex sruktúrával és specifikus szerkezeti elemekkel rendelkezik, melyeken

keresztül akár többszörös intermolekuláris kapcsolódás bekövetkezik. Felmerült a gondolat, hogy a fenti folyamatok alkalmas peptidekkel hatékonyabban gátolhatók, mert azok akár több ponton keresztül, nagyobb érintkezési felületen kapcsolódhatnak a fehérjékhez.

Ilyen irányú kutatások eredményei a HSP90 és a survivin fehérje kölcsönhatásának gátlására tervezett shepherdin peptid (Plescia et al. 2005), az aktív multichaperon komplex kialakulásának megakadályozására fejlesztett a Antp-TPR hibrid peptid (Horibe et al., 2011) és a Wu és mtsai (2012) által előállított PIER peptidek.

Korábban sokan szkeptikusak voltak a peptid-gyógyszerekkel szemben, mert a szérum és intracelluláris proteázok könnyen és gyorsan lebontják azokat. Ennek megakadályozására a hidrolízisnek ellenálló D-aminosavakat, ill. redukált peptidkötést és aminosavszármazékokat szokás beépíteni a peptidekbe. Ezeket figyelembe véve együttműködő partnereim (Orosz Antal és mtsai., 2006) korábbi, daganatellenes hatású substance P analógjaikból molekuladinamikai számításokkal olyan 4-5-tagú peptidomimetikumokat terveztek, melyek gátolták a HSP90 ATP-kötését (a HSP90 fehérjét mi azonosítottuk) és citotoxikusnak bizonyultak kissejtes tüdőcarcinóma, emlő és vastagbélcarcinóma sejtvonalakon, tüdőtumor xenograftokon. Néhány vegyületük egér limfóma tumorsejteken függesztette fel a multidrug rezisztenciát és ami a továbbiakra nézve biztató, szinergikus kölcsönhatásban megnövelte a tradicionális tumorelles szer (epirubicin) antiproliferatív hatását (Szabó J. és mtsai., 2007). Újabb vizsgálataik szerint egyik általunk is analógjuk (TCBL-145) hólyagos autoimmun betegségben (autoantitestek kialakulása a VII típusú kollagénnel szemben) a HSP90 gátlásán keresztül visszaszorította a T-sejtek szaporodását, míg a normál és autoreaktív plazmasejtekre nem volt hatással (Kasperkiewicz et al., 2011).

Új típusú, peptid alapú HSP90 inhibítorok ugyan még nincsenek klinikai kipróbáláson, de úgy gondolom, hogy ígéretes vegyületek bizonyos tumoros betegségek kezelésére.

Még egyszer megköszönöm Prof. Dr. Klebovich Imre alapos Bíráló munkáját, azt, hogy eredményeimet hitelesnek, komoly elméleti és gyakorlati hasznúnak, kiemelkedő jelentőségűnek találta és az értekezés nyilvános vitára való bocsátását, sikeres védés esetén az MTA doktori fokozat odaítélését javasolta.

Szeged, 2013, április 16.



Dr. Janáky Tamás
a kémiai tudományok kandidátusa

Irodalomjegyzék

Scaltriti M, Dawood S, Cortes J,
Molecular pathways: Targeting Hsp90—Who benefits and who does not.
Clin Cancer Res; 18: 4508–13, 2012.

Travers J, Sharp S, Workman P,
HSP90 inhibition: two-pronged exploitation of cancer dependencies
Drug Discovery Today, 17: 242-252, 2012.

Neckers L, Workman P,
Hsp90 Molecular Chaperone Inhibitors: Are We There Yet?
Clin Cancer Res. 18, 64-76, 2012.

Plescia J, Salz W, Xia F, Pennati M, Zaffaroni N, Daidone MG, et al.,
Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent.
Cancer Cell 7: 457 – 68, 2005.

Horibe T, Kohno M, Haramoto M, Ohara K and Kawakami K,
Designed hybrid TPR peptide targeting Hsp90 as a novel anticancer agent
Journal of Translational Medicine 9: 8-12, 2011.

Wu S, Dole K, Hong F, Noman AS, Issacs J, Liu B, Li Z,
gp96-Independent Inhibition of Endotoxin Response By Chaperone-Based Peptide Inhibitors
J Biol Chem. 287:19896-903, 2012.

Molnár J, Engi H, Mándi Y, Somlai C, Penke B, Szabó A, Orosz A.
In Vivo 21, 429-433, 2007.
Effects of nontoxic heat shock protein 90 inhibitor peptide derivatives on reversal of MDR of tumor cells.

Kasperkiewicz M, Müller R, Manz R, Magens M, Hammers CM, Somlai C, Westermann J, Schmidt E, Zillikens D, Ludwig RJ, Orosz A.
Heat-shock protein 90 inhibition in autoimmunity to type VII collagen: evidence that nonmalignant plasma cells are not therapeutic targets.
Blood 117, 6135-42, 2011.