

**Válasz Prof. Dr. Kremmer Tibornak, a MTA kémiai tudomány doktorának
a „Korszerű analitikai módszerek alkalmazása a peptid és
fehérjekutatásban” c.,
a MTA doktori fokozat elnyerésére benyújtott értekezésemről írt bírálatára**

Elöljáróban szeretném megköszönni Prof. Dr. Kremmer Tibornak, hogy értekezésemet rendkívül alaposan áttanulmányozta és összességében kedvező véleményt adott. Köszönöm az elmúlt 20 éves munkám meleg szavakkal történő méltatását és elért tudományos eredményeim elismerését. Ugyanakkor elnézését kell kérnem, hogy a valóban nagy terjedelmű mű elolvasása és véleményezése sok idejét elvette. Jobban figyelembe kellett volna vennem egy általam mélyen tisztelt analitikus kolléga véleményét, miszerint a „disszertáció az opponenseknek készül”, ezért rövidebbnek kellett volna lennie. Igyekeztem azonban kihasználni a MTA Kémiai Tudományok Osztálya „Követelmények a doktori műre és a tézisekre vonatkozóan” c. követelményrendszere adta lehetőségeket, azaz, hogy az értekezés *„érdemi leíró részének terjedelme max. 150 A4-es oldal”* lehet. Az értekezés hét fejezete, megítélésem szerint az *érdemi leíró része* 142 oldal, amit a Tartalomjegyzék, Rövidítések jegyzéke, Előszó, Köszönetnyilvánítás, saját és felhasznált irodalmak jegyzéke, valamint a Függelék 10 nagy táblázata növel 189 oldal terjedelműre. Való igaz, hogy nagyon szerteágazó és változatos tématerületeken dolgoztam, azonban a Bíráló is értette a szándékomat, miszerint minden elvégzett munkát „édes gyermekemnek” éreztem és be kívántam mutatni. Nem mondja ki, de egyértelmű a véleménye: „kevesebb több lett volna”! Jobban válogathattam volna az eredményeim között, ill. rövidebben kellett volna bizonyos témaköröket tárgyalni.

Minden írott műnek, legyen az pl. egy MTA doktori értekezés, kritikus pontja a legoptimálisabb, a szerző szándékát és a lényegét legjobban kifejező cím eltalálása. Így voltam ezzel én is: értekezésemben azt kívántam bemutatni, hogyan fejlesztettem, ill. használtam többnyire elválasztástechnikai (kromatográfia, gél és kapilláris elektroforézis) és tömegspektrometriás módszereket peptidek, fehérjék analízisére. A vizsgálat tárgya egyrészt szintetikus, másrészt természetes, biológiai forrásból származó peptidek és fehérjék voltak, amiket valamilyen céllal szintetizáltunk, izoláltunk, azonosítottunk, ill. meghatároztuk a tulajdonságait/koncentrációját/mennyiségét. A cél egy biológiai/élettani folyamat kiváltása, a változások nyomon követése és a történések értelmezése volt. A címnek mindezt tükröznie kellett (volna)! Az is igaz, hogy a kromatográfián, elektroforézisen és tömegspektrometrián kívül nagyon sok „korszerű analitikai módszer” létezik peptidek/fehérjék vizsgálatára (pl. CD spektroszkópia, NMR, röntgen-krisztallográfia, hogy csak a néhány kémiai analitikai

módszert említsek), de az említetteken túl immunkémiai, farmakokinetikai, biológiai aktivitás-meghatározási, chip-technológiai stb. módszereket is használtunk és ezeknek összefoglalóan adtam a „korszerű analitikai módszerek” elnevezést a címben. Egyetértek a Bírálóval, hogy az „alkalmazás” szó kihagyható lett volna a címből.

A Bíráló legfőbb kifogása az értekezéssel szemben, hogy nem sikerült a tartalom és a forma egységét, harmonikus egyensúlyát megteremtenem: a tartalom szétfeszítette a választott formát. A sokfajta módszer, a változatos kutatási terület és a legkülönbélebb eredetű biológiai minták vizsgálata, az alkalmazott tárgyalási forma, valamint annak arányainak megválasztása okozhatta ezt az érzést. Ha valamit magyaráznom kell, akkor az azt jelenti, hogy nem tudtam megfelelő módon kifejezni a szándékomat, úgy leírni, ill. átadni a mondanivalóm, mind tartalmi, mind formai szempontból, ahogy az bennem megfogalmazódott. Ezért megpróbálom az értekezés általam megcélzott formai szerkezetét röviden ismertetni kizárólag az „*érdemi rész*”-re szorítkozva.

Eredményeimet három fő fejezetben ismertettem:

2. Nagyhatékonyságú elválasztási módszerek alkalmazása a peptidkutatásban
3. Tömegspektrometria és LC/MS alkalmazása a peptid- és fehérjekutatásban
4. Proteomika

Ezeket a fejezeteket hasonló módon kívántam szerkeszteni:

- a, a vizsgálati módszer rövid általános bemutatása
- b, a módszer speciális peptid- és fehérje-analitikai vonatkozásai
- c, célkitűzések megfogalmazása
- d, eszköz és módszerfejlesztési eredmények
- e, a módszer felhasználása biológiai, leginkább orvostudományhoz kapcsolódó kísérletekben

Ismét idézem a MTA Kémiai Tudományok Osztálya „Követelmények a doktori műre és a tézisekre vonatkozóan” c. követelményrendszeréből: „*Értekezés: az előzmények, az elvégzett munka és az eredmények részletes leírása, minden tekintetben komplett és önmagában (a mögötte álló cikkek áttanulmányozása nélkül) értelmezhető és értékelhető munka. Tartalmaz alapos célkitűzést, részletes, tételes irodalmi előzményeket, megadja az alkalmazott módszerek és értékelési eljárások reprodukálható leírását, az eredmények elemző tárgyalását stb....*”. Ezen követelményeknek a bemutatni kívánt területek szerteágazósága miatt nehéz volt megfelelni és a kifogásolt aránybeli hibák emiatt fordulhattak elő. Azonban éppen a

témakörök nagy száma, más tudományterületeket (mezőgazdaság, orvostudomány, biológia, biokémia, gyógyszerkutatás stb.) érintő volta miatt fennállt annak a lehetősége, hogy a MTA Kémiai Tudományok Osztályának Doktori Bizottsága nemcsak az elválasztástechnika, tömegspektrometria és a gyógyszerészeti tudományok legavatottabb képviselői közül választ opponenst, hanem a fenti tématerületről is kér fel Bírálót. Természetesen nem várható el még minden analitikus, nemhogy orvos, biológus Bírálótól, hogy értsen az értekezésben tárgyalt módszerekhez, különösképpen azok peptid- és fehérje-analitikai vonatkozásaihoz. Ebből a megfontolásból írtam mindegyik módszerről bevezetést, ami talán a proteomikánál valóban hosszabb lett az optimálisnál. Mentségemre legyen, hogy a proteomika számos különböző elválasztástechnikai, tömegspektrometriás, chip-technológiai, bioinformatikai, biokémiai stb. módszereket használ, amit szükségesnek láttam alapszinten ismertetni.

A Bíráló szerint a tartalom és forma feloldatlan ellentmondásához vezetett, hogy szemben az előadás címével, ami az elválasztástechnikai és tömegspektrometriai módszerek tárgyalását ígéri, *„az értekezés tömegét, tematikáját döntő többségben a peptid, fehérje és proteomikai modellek vizsgálata és eredményeinek bemutatása képezi”*. Az ismertetett vizsgálati módszereket azért állítottuk be, ill. fejlesztettük tovább, hogy segítségükkel biológia, biokémia, gyógyszerfejlesztés, élettan, neurodegeneratív betegségek stb. területén felmerült problémák megoldásához járuljunk hozzá. Azért, hogy az egyes tárgyalt témakörök megfelelő keretbe legyenek foglalva, ill. érthető legyen, hogy miért és hogyan vizsgáltunk egy adott problémát, ismertetni kellett az adott modellrendszert, ill. az abban elért eredményeket. Pl. nem az volt az érdekes, hogy a 138P jelű foszforilált peptid micelláris elektrokinetikus kromatográfiás elválasztás során 7,8 perc migrációs idővel rendelkezett, hanem az, hogy sikerült kimutatni, hogy a CD45 fehérje képes defoszforilezni a T-sejt receptor (TCR)/CD3 fehérjekomplex ζ -láncát. Meg kell jegyezni, hogy az értekezés 73 ábrájából 41 db kromatogram, kapilláris elektroferogram, 1D-, v. 2D-gélelektroferogram, tömegspektrum, 12 db az ezekből a mérésekből származó adatok ábrázolása, 10 db a peptidek, fehérjék szerkezetét mutatja be, közvetlen állatkísérleti elrendezést, ill. eredményt bemutató ábrák száma 3-4. Hasonlóképpen a 24 táblázatból kettő kivételével mindegyik retenciós időt, migrációs időt, molekulatömeget, fehérjék szekvenciafedettségét, tehát kémiai analitikai eredményeket, míg 5 db a retenciós idők mellett többségében biológiai aktivitásmérésből származó adatokat tartalmaz.

Prof. Dr. Kremmer Tibor konkrét megjegyzéseire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

1. A kromatográfia tudományágat megteremtő tudós nevének helyesírásáról.

Az elválasztástechnika hazai szakirodalmának Kremmer Tibor Torkos Kornéllal írt közös könyvében összegyűjtött forrásművek, könyvek, jegyzetek valószínűleg mindegyike Mihail Szemjonovics Cvet módon írta le Михайл Семёнович Цвет orosz (?) botanikus nevét. Én is így tanultam meg, ezért semmi szándékosság nem volt az angolszász írásmód alkalmazásával, elnézést kérek érte. Azonban azt hiszem, hogy nem követtem el nagy hibát két ok miatt sem:

- a, A Magyar Tudományos Akadémia „A magyar helyesírás szabályai” könyvének 221. pontja a következőket írja:

A szaktudományok, az idegenforgalom, a postaforgalom, az egyetemi és főiskolai oktatás, a tudományos ismeretterjesztés területén, továbbá a térképeken olyan átírást szokás alkalmazni, amelyet az adott nyelvet beszélő országban hivatalosan előírnak, vagy elterjedten ismernek, amelyet a szaktudományok a nemzetközi érintkezésben általában alkalmaznak, vagy amelyet valamely nemzetközi testület (amelynek hazánk is tagja) használatra javasol. E helyett vagy e mellett – a munka jellegétől függően – a magyar átírás is alkalmazható.

Nem vagyok biztos benne, ha egy amerikai kromatográfusnak **Tswett** helyett a **Cvet**-et írnék, azonnal tudná, hogy kiről van szó.

- b, M.S. Cvet orosz apától, olasz anyától Olaszországban született 1872-ben. Nem tudom, hogy Asti olasz kisvárosban hogyan jegyezték be nevét az anyakönyvbe. Svájcban nevelkedett, de azt sem tudom, hogy lausanne-i, majd genfi tanulmányai idején, ill. PhD disszertációjában hogyan írta nevét. Tudományos tevékenységét először Szentpéterváron (1896), Kazanyban (1901), majd Varsóban folytatta. 1906-ban innen küldte első, a kromatográfia szót említő közleményét a Német Botanikai Társaság folyóiratába [1], ahol az Mikhail Tswett néven jelent meg. (Az adatok Leslie S. Ettre-től, azaz Ettre Lászlótól, három éve elhunyt nemzetközi tekintélyű kromatográfus közleményéből származnak [2].)

2. Mint ismeretes, a magyar nyelvben már egy írásjel, nemhogy egy szó is megváltoztatja a mondat értelmét. Ez történt a kolecisztokinin hatású caerulein peptid tulajdonságainak ismertetésekor is: két, külön-külön igaz tagmondatot az *ezért* határozószóval összekapcsoltam, melynek eredménye egy hamis állítás lett. Helyesen így szól a mondat: „Gyulladásos folyamatokat indít, így pl. hasnyálmirigy-gyulladást indukál. Az epehólyag,

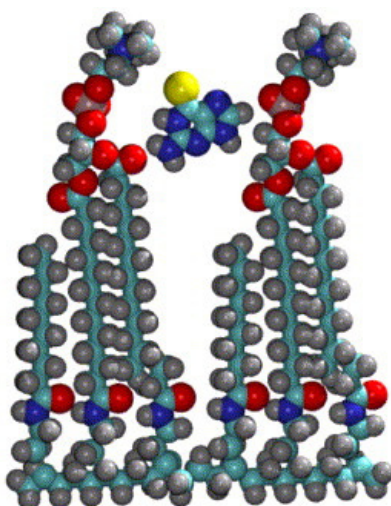
az epe utak és az emésztőrendszer radiológiai diagnosztikájában, hasnyálmirigy működési zavarainak diagnosztikájában, ill. a paralitikus ileum posztoperatív kezelésében használták.” A különbség az alkalmazott dózisban van: diagnózishoz 0,1-0,2 µg/kg testsúly mennyiségeket használtak, míg pancreatitist 5-10 µg/kg, ún. szupramaximális dózissal lehet kiváltani. Így diagnosztikumként csaknem rizikó nélkül alkalmazhatták [3,4].

3. A több diszulfidhidat tartalmazó peptidek szintézisének a diszulfidhidak kialakításra bevett eljárás a ciszteineket tartalmazó peptid híg oldatának (0,05 mM) levegőn történő kevertetése, melynek során lassan oxidálódva kialakulnak a diszulfid hidak. A reakcióelegy a peptid mennyiségétől függően 1-2 liter is volt. Injektáláson „preparatív” kromatográfiában is azt értjük, hogy a mintát (5-10 ml reakcióelegy) fecskendővel juttatjuk be a kromatográfiás rendszer folyadékáramába. 1-2 liter minta esetén ez a megoldás nem célszerű, ezért a „preparatív” HPLC pumpát „injektorként” használva 80 ml/perc áramlási sebességgel rápumpáltuk a mintát a fordított fázisú kromatográfiás oszlopra (47x300 mm). A kromatográfia kiindulási eluense 13% acetonitrilt tartalmazott, így a vizes oldatból a peptid az oszlop tetején vékony sávban koncentrált és jó hatásfokú elválasztás volt elérhető.
4. A kapilláris elektroforézisben az elválasztást leggyakrabban kvarc kapillárisban hajtják végre. A kvarc kapilláris belső felületén lévő különböző típusú szilanol csoportok találhatók (izolált, geminális, vicinális), eltérő savi erősséggel (pK_s 2-9). A kvarc felületének ionizáltsági állapota és ezen keresztül az elektroendozmotikus áramlás nagysága is a mozgófázis pH-jától függ. A felület széles pH-tartományban negatív töltéssel rendelkezik, ezért ionos kölcsönhatást képezhet az analizálandó peptidekkel, fehérjékkel, ami azok kitapadásával járhat. Ezeket a hatásokat csökkenti, ill. küszöböli ki a kapilláris belső falának bevonása. Erre a célra legjobban a lineáris poliakrilamid vált be. Önmagában a poliakrilamid valóban hidrofílnak anyagnak. Félreérthető megfogalmazással ugyan, de azt akartam érzékeltetni, hogy a polimer befedi, eltakarja az ionos felületet és megakadályozza a peptidek/fehérjék kitapadását [5].
5. A kromatográfiás oszlopon történő elválasztások során elérhető érzékenység fordítva arányos az oszlop belső átmérőjével, így kapilláris- és nano-HPLC oszlopokon nagyságrendekkel kisebb anyagmennyiségek analizálhatók, mint az analitikai oszlopokon.

Az átmérő csökkenésével arányosan kisebb áramlási sebességeket kell alkalmazni (0,2-5 μ l/perc). 1994-ben, amikor beszereztük első tömegspektrométerünket, kereskedelmi forgalomban nem volt elérhető sem kapilláris, sem nano-HPLC oszlop, sem a méretben és elrendezésben hozzájuk illő elektroporlasztásos ionforrás. Ezek az oszlopok és az MS-hez történő kapcsolódást megoldó egységek kis utánjárással, hozzáértéssel, sok ötlettel és még több lelkesedéssel majdnem minden laboratóriumban elkészíthetők. Igaza van a Bírálónak, hogy *„a pezsgős dugóval egyenértékű, megfelelő szigetelőanyagból kialakított és precíziós műszerhez jobban hasonlító idomdarab bemutatása műszakilag és esztétikusan is jobban mutatott volna.”* Alkalmazásával százszor nagyobb érzékenységet értünk el, jó minőségű kapilláris-LC-MS spektrumokat kaptunk. Ionforrásunk fényképét nem közöltük le, csak a használatával készült eredményeket. Megoldásunkra csak úgy hivatkoztunk, mint egy „home-made nanoelectrospray interface”.

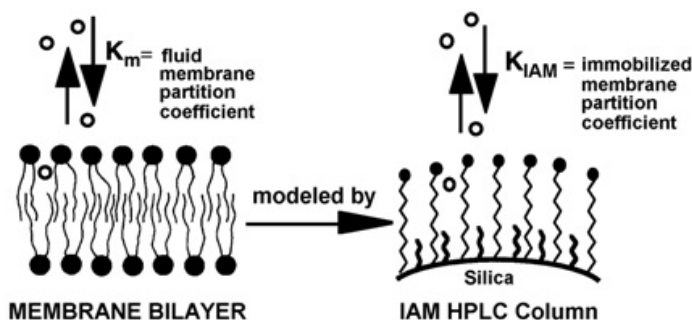
Hasonlók mondhatók el a kapilláris elektroforézis és a kapilláris elektrokinetikus kromatográfiás egységek kialakításáról és használatáról is.

6. Membránfehérjék tisztítására, gyógyszerjelölt vegyületek membránokkal való kölcsönhatásainak, membránokon keresztül történő transzportjának vizsgálatára Charles Pidgeon [6] a Purdue University-n (West Lafayette, IN) fejlesztette ki a „immobilized artificial membrane chromatography”-t (IAMC), azaz a „rögzített mesterséges membrán kromatográfiát”, melynek oszlopait a Regis Technologies, Inc. (Morton Grove, IL) gyártja. Az IAM kromatográfia tölteteit úgy tervezték, hogy felületük minél jobban hasonlítson a sejtmembrán lipid rétegére. A foszfatidilkolin (PC) a sejtmembrán felépítésében résztvevő legfontosabb foszfolipid. Foszfatidil-kolin analógoknak aminopropil szilika kromatográfiás töltetre történő kapcsolásával (IAM.PC) a sejtmembrán egy rétegéhez hasonló amfifil felszín jön létre, ami egyrészt képes membránfehérjéket megkötni (membránfehérjék tisztítása), másrészt felhasználható molekuláris kölcsönhatásainak tanulmányozására.



Kis molekulák sejtmembránnal való kölcsönhatása jellemezhető a membrán és a felette lévő folyadékfázis közötti megoszlással (K_m), ami modellezhető az IAM tölteten meghatározható megoszlással (K_{IAM}). Az IAM oszlopon mérhető retenció (k'_{IAM}) arányos a membránkölcsönhatás erősségével, ill. a membrán áteresztőképességével

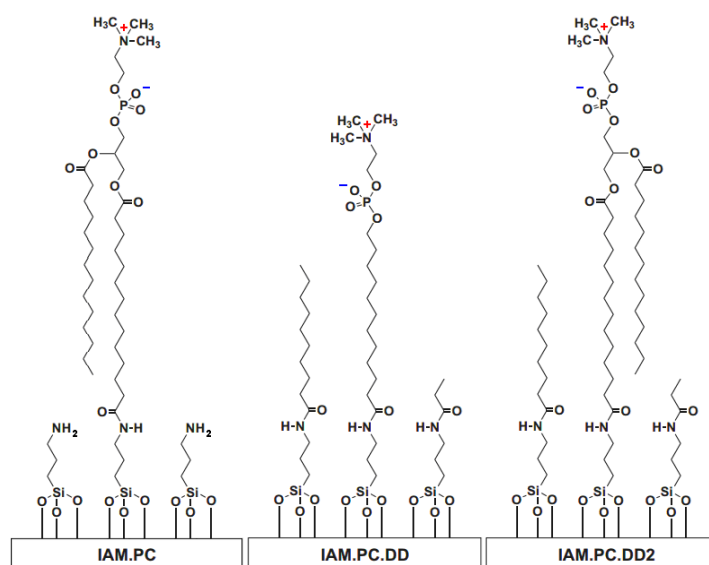
$$(k'_{IAM} = (t_{Rx} - t_{R0})/t_{R0}).$$



Az oszlop kifejlesztői igazolták, hogy az IAM-kromatográfiával kapott adatok jobban korrelálnak Caco2 sejteken mért valódi membrántranszport adatokkal, mint más kromatográfiás technikával modellezett eredmények. A C18 fordított fázisú tölteteken a retenció (főleg) hidrofób kölcsönhatásokon alapszik, míg az IAM tölteteken hidrofób, elektrosztatikus és hidrogénkötések kombinációja szabályozza a kölcsönhatás mértékét, ami jobban megfelel a biológiai membránoknál megfigyelhető kölcsönhatásoknak. Ez, az IAM kromatográfiával mérhető kölcsönhatás az ún. foszfolipofilicitás.

A gyógyszerjelölt vegyületek membrántranszportjának modellezésére újabb IAM tölteteket fejlesztettek ki (IAM.PC.DD, IAM.PC.DD2). A Drug Discovery oszlopokat készítették csak egy hidrofób láncot tartalmazó foszfokolin-származékkal (DD), ill. a

nagyobb retenciót biztosító foszfatidil-kolinnal is (DD2), amelyekben a felületi aminocsoportokat C3/C10 karbonsavakkal acilezték. Ezek az oszlopokon kapott adatok kiváló egyezést mutattak a tradicionális, azonban rendkívül munkaigényes membrántranszport-meghatározási kísérletek (Caco-2 sejtkultúra, vékonybél szövet vagy liposzóma assay-k) eredményeivel [8].



7. A 3.4. Vizsgálatok LC/MS-sel alfejezet első alpontjában (3.4.1.), összesen 7 oldalon foglaltam össze a tömegspektrometria gyógyszerkutatás korai fázisaiban történő alkalmazási lehetőségeit, ill. az ezen a területen elért eredményeinket. Ezt most sem találom hosszúnak, mert rendkívül fontos lehetőségeket villant fel, inkább a további témakörök számát lehetett volna csökkenteni.
8. Az értekezés leghosszabb, 66 oldal terjedelmű 4. fejezetében a proteomika területén végzett munkáimat foglaltam össze, azonban csak ez a fejezet megítélésem szerint nem lett volna elegendő az MTA doktori értekezés benyújtásához. A 90-es évek végén az első és egyetlen laboratórium voltunk Magyarországon, ahol proteomikai fehérjeazonosításokat végeztünk. Az akkor kialakult számos kooperáció eredményezte ennek a fejezetnek a sokszínűségét. A más egyetemekkel, kutatóintézetekkel közösen végzett munka eredményein túl ez a fejezet tartalmazza a laboratóriumunk saját kutatásainak bemutatását is. A 28 db, többnyire rangos nemzetközi folyóiratban megjelent

közlemény tartalmát nehéz lett volna rövidebben összefoglalni. A célkitűzésekben az egymáshoz hasonló tartalmú kísérleteket igyekeztem egy pont alá vonni.

A Bíráló az értekezés alapos átnézése során a legkisebb szakmai hibákat is észrevette, így nem került el a figyelmét, hogy az elektroforézishez alkalmazott poliakrilamid gélekkel kapcsolatosan helytelenül említettem annak viszkozitását. Az akrilamidból katalizátorok és iniciátorok hatására gyökös polimerizációs folyamatban nagy molekulású lineáris poliakrilamid képződik, melynek vizes oldata nagy viszkozitású. Azonban, ha keresztkötő ágens, pl. N,N-metilén-bisz-akrilamid jelenlétében hajtjuk végre a polimerizációt, a hosszú poliakrilamid láncok között "hidak" képződnek és térhálós szerkezetű gél jön létre, melynek viszkozitásáról már nem beszélünk. A kialakult szerkezet következtében a gél molekulaszűrőként viselkedik. Ezt a tulajdonságát elsősorban a gél átlagos pórusmérete határozza meg, ami az akrilamid-monomer koncentrációjának és a térhálósító N,N-metilén-bisz-akrilamid százalékos arányának alkalmas megválasztásával tág határok között változtatható. A gél mechanikai tulajdonságai 5-20% akrilamid koncentráció-tartományban kedvezőek. A keresztkötő metilén-bisz-akrilamid mennyisége az akrilamid-monomernek rendszerint 1-3%-a.

Még egyszer szeretném megköszönni Prof. Dr. Kremmer Tibornak, hogy fáradságos munkával oly gondosan átnézte értekezésemet. Kritikáját, hogy a tartalom és forma harmonikus egységét nem sikerült eltalálnom, ill. hogy jobban kellett volna válogatnom a bemutatott eredményekből és rövidebben kellett volna tárgyalni egyes témaköröket, természetesen elfogadom. Ugyanakkor köszönöm, hogy munkámat hitelesnek és értékesnek találta, és az értekezés nyilvános vitára tűzését és sikeres védelem esetén számomra az MTA doktori fokozat megítélését támogatja.

Szeged, 2013, április 15.



Dr. Janáky Tamás
a kémiai tudományok kandidátusa

Irodalomjegyzék

- [1] Mikhai Tswett
"Physikalisch-Chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorption"
Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft 24, 316–326, 1906.
- [2] Ettre LS.
M.S. Tswett and the Invention of Chromatography
LC•GC Europe September 2003, pp. 2-7.
- [3] Nakazawa S., Naito Y., Yamamoto Y., Yamase H., Sobue K., Ichikawa M., Hattori T.
The application of caerulein to cholangiography.
Gastroenterol Jpn. 11, 341-6, 1976.
- [4] Cavallini G., Mirachian R., Angelini G., Vantini I., Vaona B., Bovo P., Gelpi .F, Ederle A., Dobrilla G., Scuro LA.
The role of caerulein in tests of exocrine pancreatic function.
Scand J Gastroenterol. 13, 3-15, 1978.
- [5] Horvath J. and Dolník V.
Polymer wall coatings for capillary electrophoresis
Electrophoresis 22, 644-655, 2001.
- [6] Pidgeon C., Ong S., Liu H., Qiu X., Pidgeon M.
IAM chromatography: an in vitro screen for predicting drug membrane permeability.
J. Med. Chem. 38, 590-594, 1995.
- [7] Lepont C., Poole CF.
Retention characteristics of an immobilized artificial membrane column in reversed-phase liquid chromatography
J. Chromatogr. A. 946, 107–124, 2002.
- [8] Artursson P.; Karlsson J.
Correlation Between Oral Drug Adsorption in Humans and Apparent Drug Permeability Coefficients in Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 175, 880–885, 1991.