

OPPONENSI VÉLEMÉNY

Dr. Janáky Tamás

***”Korszerű analitikai módszerek alkalmazása a
peptid- és fehérjekutatásban ”***

című MTA doktori értekezéséről.

Az elmúlt 15 évben nagymértékben felértékelődött a különböző típusú korszerű nagyhatékonyságú elválasztástudományi, bioanalitikai, tömegspektrometriás vizsgálatok szerepe a korszerű peptid- és fehérjekutatásban, a diagnosztikában, a növény-nemesítésben és a gyógyszerkutatásban. A 21. században, a modern, célirányos proteomikai kutatásokban napjainkban egyre nő, felértékelődik a különböző új típusú bioanalitikai, LC-MS/MS, CE-MS és bioinformatikai vizsgálatok szerepe. Mindez nem nélkülözheti a komplex kutatási szemléletet, az alapkutatástól a multidiszciplináris alkalmazott kutatásokig. Ez a multidiszciplináris tudás igénye, az elmélet és a gyakorlat szempontjából egyaránt jelentős kihívást jelent a fenti területen dolgozó szakember számára.

Jelen akadémiai doktori értekezés kiváló példája ennek az egyre erősödő biológiai szemléletű nemzetközi tendenciának. A Jelölt igen masszív klasszikus biológiai, továbbá proteomikai, bioanalitikai műszeres mérési alapokra, és ezek kombinált tudására épülő, a legfejlettebb technikákat és vizsgáló módszereket sorakoztatja fel munkássága kapcsán, amivel összességében jelentős, magas színvonalú gyakorlati és elméleti eredményeket prezentál.

Így a disszertáció alapvető fő célkitűzései és azok megvalósításának minősége a legkurrensebb nemzetközileg publikált korszerű témák közé tartozik, amit jól bizonyít, hogy a komplex bioanalitikai, proteomikai vizsgálati módszerekkel foglalkozó publikációk száma az elmúlt nyolc évben megtizenötszöröződött.

Ma az alkalmazott biológiai kutatáshoz korszerű biokémiai, analitikai, radioanalitikai módszerek és berendezések tárháza szükséges. A disszertáció szerzője a peptidek, fehérjék és hormonok széleskörű proteomikai vizsgálataival, számos tudományterületen több szegmensű

analitikai (LC, CE) és tömegspektrometriai vizsgálata terén végzett több évtizedes kutató munkáját foglalta össze.

A benyújtott tézisek egyik pozitívuma, hogy egyesíteni tudja a proteomikai vizsgálatokhoz szükséges biológiai, bioanalitikai fejlesztés és új vizsgáló módszerek együttes szellemiségét, komplexitását, egyben bizonyítja a Jelölt széles irodalmi jártasságát.

Az értekezésen belül az egyes fejezetek terjedelme és egymáshoz viszonyított aránya optimálisnak mondható, bár az értekezés össz-oldalszáma a függelékekkel meghaladja az ideális terjedelmet. Néhány fejezet tárgyalása túl részletes.

A vizsgálatokhoz alkalmazott módszerek a legkorszerűbbek. A disszertációban összefoglalt vizsgálatok jelentős része részben alapkutatás, részben alkalmazott kutatás jellegű, amely túlmutat az új analitikai módszerekkel kapott eredményeken, más biológiai kutatási területek gyakorlatában is jól hasznosítható.

A Szerző kutatási eredményeiből készített téziseit 3 fő fejezetben és számos alfejezetben, a függelékekkel együtt 189 oldalon foglalja össze. Tudományos eredményeit 73 ábra és 14 táblázat felhasználásával dokumentálja. A függelék 10 részletes táblázatot tartalmaz. Mindez imponáló, egyben jól segíti az értekezés érthetőségét. A disszertáció felépítése logikus, jól nyomon követhető.

Külön kiemелendő a 4 oldal terjedelmű rövidítések jegyzéke és az igen részletes 370 db, minden igényt kielégítő irodalmi összefoglaló, valamint a jól elkülönülő 62 saját irodalmi hivatkozás gyűjteménye. A Jelölt nemcsak a tudományos publikációival ért el jelentős elismeréseket, hanem könyveivel, könyvfejezeteivel, jegyzeteivel és 6 szabadalmával is, amely bizonyítja a kísérletes vizsgálati hozzáértésén túl a tudományos oktatói és rendszerbefoglaló képességét is.

A disszertáció formai szempontból megfelel az MTA doktori értekezések követelményeinek, különösen gondos munka, dokumentációja mintaszerű, ortográfiája modern, következetes. Külön kiemелendők az igen szemléletes összefoglaló ábrák, táblázatok, és a függelék összefoglaló táblázatai 23 oldalon, amelyek jól követhetővé és érthetővé teszik az értekezést.

A vizsgálatok tervezése és precíz kivitelezése, meggyőzi a bírálót, a Jelölt experimentális vizsgálatokban való jártasságáról is. Mindez mutatja a Szegedi Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében Szentgyörgyi Albert professzor óta elkezdett kiváló műhelymunka elméleti és gyakorlati eredményességét.

A Jelölt, a proteomikai és analitikai eredményeit a nagy hatékonyságú elválasztástechnikai módszerek (HPLC, CE) és a különböző típusú kapcsolt tömegspektrometriás technika,

úgy mint az LC-MS, LC-MS/MS, CE-MS, CEC-MS, IAMC-MS, nano- és mikro-ESI ionforrások, stb., mint központi vizsgáló módszerek köré csoportosította. A disszertációban szereplő analitikai technikák arzenáljából csak a legfontosabbakra térnék ki a fő alkalmazásokkal:

- Eredményesen alkalmazta az általa kidolgozott preparatív HPLC módszereket peptidek tisztítására, ill. analitikai HPLC, CE és CEC módszereket az előállított peptidek minőségellenőrzésére.
- Bizonyította, hogy a micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC) kitűnően alkalmazható a TCR/CD3 fehérjekomplex fragmenseinek és a foszfopeptidek tisztaság ellenőrzéséhez.
- Nagy érzékenységgű kapilláris LC-MS mérésekhez új kapilláris HPLC és CE oszlopokat fejlesztett ki a statikus és dinamikus nano- és mikroESI tömegspektrometriás ionforrásokhoz. Ezek segítségével Magyarországon először végzett kapilláris LC-nanoESI-MS vizsgálatokat.
- Új "Rögzített mesterséges membrán kromatográfia-MS" módszert az IAMC-MS technikát dolgozott ki a foszfolipofilicitás gyors meghatározására, amelyet sikeresen alkalmazott danzilezett tripeptid analógok meghatározására.
- Potenciális gyógyszerjelölt molekulák vizsgálatához új MS, LC-MS LC-MS/MS módszereket fejlesztett, amelyek segítették új peptidkönyvtárak jellemzését.
- A világon először igazolta, hogy a neurohipofízis nemcsak a hipotalamikus eredetű oxitocin és vazopressin tároló szerve, hanem önmaga is képes termelni a két hormont, mindehhez új LC-MS módszereket dolgozott ki.
- Új "label-free MS" módszert dolgozott ki az 1D-2D-PAGE módszerekhez, ezzel a fehérjeexpresszió pontosabban meghatározható.
- A mezőgazdasági növény-nemesítéshez kapcsolódóan búza, tritikálé magokat, lucerna proteomikai allergének fehérjeazonosítását dolgozta ki különböző MS technikákkal.
- Tömegspektrometriás módszerekkel derítette fel a Hepatitis B vírus X-fehérjéjének szerkezetét és a diszulfidhidak elrendeződését.
- A Jelölt lebilincselő jártasságát mutatja az alkalmazott biológiai kutatásokban, hogy számos MS módszert fejlesztett ki: a szorongás fehérje expressziójának; a tumoros sejteken hatékony „Substance P” analógok; az AIDS gyógykezelésében használt nukleozid analógok jelátviteli mechanizmusának; az Alzheimer kór patológiájában szerepet játszó "amiloid-béta1-42" peptid vizsgálatára, továbbá itt nem részletezett több proteomikai vizsgálatához.

Részletes megjegyzések és kérdések

A bíráló feladata a mű méltatásán kívül kritikai megjegyzések ismertetése. A bíráló zavarban van, mert az elkészített disszertáció különösen gondosan kivitelezett munka, olvasása közben csak elvétve merülnek fel szakmai bíráló megjegyzések, ezek is javarészt, szerkesztési és formai kifogások.

- Az értekezésben lévő színes kromatogrammok igen demonstratívak. A 65. oldalon a 36. ábrán a HPLC kromatogrammon nincs feltüntetve a fehérjekeverék komponenseinek a neve csak a molekula tömege. A 2. táblázatban sem szerepel az adott molekulatömeg szekvenciája.
- A 78. oldal 45B ábráján a CEC-nanoESI-MS spektrumon nem tüntette fel a pirossal és feketével számozott peptid nevét.
- A 104. oldalon a 8. táblázatban a megváltozott expressziójú fehérjék adataiban a megadott szekvencia lefedettség 6-68% között mozog az egyes mintákban. Kérdezem, hogy ez a lefedettségi szint elegendő e a pontos azonosításhoz?
- Kérdésem, hogy a 130. oldalon leírt új típusú Hsp90 inhibitorok milyen új alternatívát nyújthatnak a különböző típusú tumoros betegségek terápiájában, mivel ez nincs megemlítve a szövegben.

Az értekezés tudományos eredményei

A Jelölt az alapkutatás jellegű elméleti és gyakorlati eredményeit 18 pontban foglalja össze, számos alfejezettel kiegészítve. A kiemelkedő eredményeket 6 pontban összegzi. Figyelemre méltó az eredmények széles gyakorlati hasznosíthatósága. Az Opponens ezeket új tudományos eredményeknek fogadja el. Az eredményeket javarészt neves külföldi folyóiratokban publikálták.

- Protokollt dolgozott ki a szintetikus peptidek tisztaságellenőrzésére, fizikai-kémiai tulajdonságainak meghatározására, kombinálva két ortogonális technikát a HPLC és az MEKC technikákat.
- Új 55 darab citotoxikus csoportot tartalmazó LH-RH származékot állított elő, amelyek különböző karcinogén sejtvonalakon tumorellenesnek bizonyultak.
- Extrém nagy érzékenységű LC-MS módszer kidolgozásával először bizonyította, hogy a hipofízis képes az oxitocin és a vazopressin termelésére, nemcsak tárolására.
- Új proteomikai módszert dolgozott ki a fehérjék 2D-elválasztása után poliakrilamid gélből történő kvantitatív meghatározására.

- Proteomikai módszerrel fehérjéket azonosított legkülönbözőbb típusú biológiai mátrixokból: lucernából, talajlakó baktériumból, fonalféregből, élesztőből, gabonafélékből, továbbá egér, patkány és humán szövetből. Az azonosított fehérjék új kölcsönhatásait derítette fel.
- A szorongás egy új típusú állapotmodelljének kidolgozásával és proteomikai analízisével kimutatta, hogy az agyban a szorongás milyen biokémiai folyamatokat érint. Meghatározta, hogy Alzheimer kórban szerepet játszó 1-42 peptiddel milyen fehérjék lépnek kölcsönhatásba, valamint az A β 1-42 milyen folyamatokat indukál az agyban. Proteomikai módszerek alkalmazásával kimutatta, hogy az ösztadiol állatkísérletben kivédi az amiloid neurotoxikus hatását.

Összefoglalásképpen ismételten ki kell emelni **Dr. Janáky Tamás** hiteles adatokon nyugvó igen értékes, széleskörű elméleti és gyakorlati munkásságát, amely bizonyíthatóan hozzájárult a tudományterület jelentős fejlődéséhez. Az értekezés kimagasló szintű szerteágazó kísérleti adatai és az új peptid és fehérje analitikai vizsgáló módszereinek eredményei bizonyították a Jelölt kutatási rátermettségét és precíz kísérlettervezését, valamint sokoldalú képességeit. Új módszertani bázist teremtett a proteomikai vizsgálatokhoz, valamint új bioinformatikai módszerek bevezetésével rászorgált pályatársai megbecsülésére és tiszteletére. A korszerű magyarországi proteomika meghonosítója és nemzetközileg elismert szakembere.

Megjegyzéseim az értekezéshez, a több évtizedes kimagasló kutatási tevékenység egészét nézve, nem érdemiek.

Mindezek alapján **Dr. Janáky Tamás** disszertációját komoly elméleti és gyakorlati hasznú, kiemelkedő munkának tartom, amely messze megfelel az MTA doktora tudományos fokozat szakmai és formai követelményeinek.

Ezért, messzemenőleg javaslom az értekezés nyilvános vitára való bocsátását és sikeres védés esetén az MTA doktora fokozat odaítélését.

Budapest, 2013. január 20.



Dr. Klebovich Imre
az MTA doktora
egyetemi tanár