

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Transzglutaminázok vizsgálata a proliferatív vitreoretinopátiában és a neutrofil
extracelluláris csapda képződésében**

Márkus Bernadett

Témavezető: Dr. Csősz Éva, PhD



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2018

Transzglutaminázok vizsgálata a proliferatív vitreoretinopátiában és a neutrofil extracelluláris csapda képződésében

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Márkus Bernadett
Okleveles Molekuláris biológus

Készült a
Debreceni Egyetem
Molekuláris sejt- és immunbiológia doktori iskolája keretében
Témavezető: Dr. Csősz Éva, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Bíró Sándor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora
Prof. Dr. Janáky Tamás, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Molekuláris Medicina Kutató
Központ könyvtára

2018. május 31. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora
Dr. Drahos László, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Bíró Sándor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora
Prof. Dr. Janáky Tamás, az MTA doktora
Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora
Dr. Drahos László, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Bőrgyógyászati Tanszék
előadóterme

2018. május 31. 13 óra

1. Bevezetés

1.1 Transzglutaminázok

A Ca^{2+} -függő transzglutaminázok (TGázok) olyan multifunkcionális enzimek, amelyek szerepet játszanak a fiziológiás és patológiás folyamatokban. A TGázok katalizálhatják a fehérjék poszt-transzlációs módosításait a lizin és glutamin oldalláncok között kialakult ϵ -(γ -glutamil)-lizin izopeptid keresztkötések révén.

A TGázokat mikroorganizmusokban, növényekben, gerinctelenekben és gerincesekben is azonosították. A XIIIa faktor stabilizálja a fibrin alvadékot és részt vesz a sebgyógyulásban, a keratinocita TGáz (TG1) részt vesz a keratinociták terminális differenciálódásában, és a mindenhol előforduló szöveti TGáz (TG2) számos funkcióval rendelkezik. Az epidermális TGáz (TG3) részt vesz a keratinociták terminális differenciálódásában és az elszarusodott burok kialakulásában, a prosztata TGáz (TG4) szerepet játszik a termékenységekben. TGáz 5 szerepet játszik a keratinociták differenciálódásában, míg a TGáz 6 a központi idegrendszerben expresszálódik és a közelmúltban felfedezett TGáz 7 szerepet játszik a fémion kötésben és a poliaminok fehérjékhez történő konjugációjában. Végül létezik egy TGáz-szerű fehérje, a vörösvértest 4.2 sáv fehérje, amely a TGáz inaktív formája, nem rendelkezik enzimatisz aktivitással, mivel cisztein (Cys) aminosav helyett alanin van az aktív helyén.

1.2 Transzglutamináz szubsztrátok és interakciós partnerek

A TGázok a szubsztrátokkal és interakciós partnerekkel való kölcsönhatás révén fejtik ki hatásukat. A TGázok funkcionális szerepének kimutatásához fontos szubsztrátjainak és interakciós partnereinek különböző típusú sejtekben és szövetekben való azonosítása. A TRANSDAB adatbázis (<http://genomics.dote.hu/wiki>) információt gyűjt a TGáz szubsztrát fehérjéről és interakciós partnerekről és több mint 500 cikket tartalmaz a FXIIIa, a TG1, a TG2, a TG3, a TG4, a TG5 és a mikrobiális TGáz 340 szubsztrátjáról és közel 80 interakciós partneréről.

1.3 A transzglutaminázok funkciója

A TGázok által katalizált keresztkötés során tioészter kötés alakul ki az aktív hely Cys SH csoportja és a glutamil szubsztrát γ -karboxamid-csoportja között és ammónia szabadul fel termékként. Ezt követően a peptid-kötött lizin oldallánc ϵ -aminocsoportjára vagy az amin donor szubsztrát szabad aminjára kerül az acil csoport ϵ -(γ -glutamil)-lizin izopeptid kötés kialakulását eredményezve. A transzamidációban a monoaminok és poliaminok is részt vehetnek. A transzamidálás mellett a különböző TGázok esetében a deamidáció és az izopeptid kötés hidrolízise is megfigyelhető.

A TG1 egy Ca^{2+} -függő enzim, amely részt vesz a többrétegű laphám terminális differenciálódásában és az elszarusodott burok kialakulásában. A keresztkötés biztosítja az epidermisz szilárdságát és stabilitását, illetve részt vesz a test és a környezet közötti védő barrier kialakulásában. A TRANSDAB adatbázis 14 TG1 szubsztrátot tartalmaz.

A TG2 túlnyomórészt klasszikus Ca^{2+} -függő enzimként működik, de Ca^{2+} -független enzimatis és nem enzimatis aktivitást is azonosítottak, számos sejttípusban előfordul és a szövetekben különböző biokémiai funkcióval rendelkezik. A fehérjék Ca^{2+} -függő poszt-transzlációs módosításait katalizálhatja, beleértve a glutamin deamidációt, a fehérjén belüli és fehérjék közötti keresztkötés kialakulását, valamint a primer aminok fehérjékbe való beépülését. A TG2 rendelkezik izopeptid kötés hasítási aktivitással, kinázként funkcionálhat, G-fehérjeként működhet, képes kötni és hidrolizálni a GTP-t, valamint fehérje-diszulfid-izomeráz aktivitással is rendelkezik. A TG2 enzimatis és nem enzimatis aktivitásai szerepet játszanak számos kritikus fontos sejtfolyamatban, mint például sejtadhézió, növekedés, migráció, differenciáció, programozott sejthalál és az extracelluláris mátrix (ECM) összeszerelése. A TG2 a sejtfelszínen és az ECM-ben is jelen lehet, ahol több olyan szubsztátot köt keresztbe és szabályoz, amelyek lehetővé teszik az ECM összeszerelődését és a sejt-mátrix kölcsönhatások átalakítását, biztosítva a szöveti stabilitást. A TG2 fontos szerepet játszik a sejtek kötődésében és terjedésében, a sebgyógyulásában, az angiogenezis elősegítésében és gátlásában.

1.4 Transz glutaminázok a betegségekben

A TGázok számos emberi betegségben közreműködnek. A TG1 aktivitása drasztikusan csökken a lamelláris ichthyosisban, amely mind az epidermiszre, mind a hajra hatással van. Ebben a bőrbetegségben szenvedő betegeknél a TG1 gén számos mutációját azonosították, amelyek a megfelelő keresztkötések hiányával vannak kapcsolatban. A *TG1* knock-out egerekben a bőr barrier funkció drasztikusan romlott, és ezek az állatok néhány órán belül elpusztultak.

A TG2 hozzájárulhat autoimmun, gyulladásos, krónikus degeneratív, malignus és anyagcsere betegségekhez. A TG2 hiány késleltetett seb lezárást okozhat, ami értékes lehet a heg kialakulásának csökkentésében. A TG2 knock-out állatok életképesek és fenotípusosan normálisak, de számos abnormalitást is hordoznak az apoptózisban, a gyulladásos és autoimmun reakciókban.

A **proliferatív vitreoretinopátia (PVR)** egy rendellenes sebgyógyulási válasz a szemben, amely komoly szövődményként jelentkezhet a retina leválást korrigáló műtétek után. A PVR pontos patogenezise még nem teljesen tisztázott. A TG2-ről ismert, hogy emberben megtalálható a PVR membránokban, ahol feltehetően részt vesz a szövetek stabilizálásában és a sebgyógyulási folyamatokban, de a pontos szerepe még nem tisztázott.

1.5 NET képződés különböző faktorok hatására

A humán neutrofil granulociták az immunrendszer fontos részét képezik, és szükségesek a különböző mikrobiális fertőzések érzékeléséhez és ellenőrzésekhez. A neutrofilek gyulladásos ingerek hatására aktiválódnak és neutrofil extracelluláris csapdák (NET) kialakulásához vezetnek, ami a sejthalál egyik egyedi formája. Ezen folyamat során a neutrofilek eltávolíthatják a nukleoplazma és a citoplazma komponensek keverékét, egy hálózatszerű struktúrát eredményezve, amely képes csapdázni, semlegesíteni és eltávolítani a behatoló patogéneket.

1.6 Kétdimenziós gélelektroforézis és tömegspektrometria a proteomikában

A proteomika segíthet megérteni a sejt szabályozó folyamatait és patológiás mechanizmusait, megfigyelni, azonosítani és jellemezni egy sejt, szövet vagy biológiai folyadék fehérjéit. Kétféle stratégiát, az úgynevezett „bottom-up” és „top-down” proteomikát alkalmazhatunk a fehérjék jellemzésére. A „bottom-up” proteomika során a fehérjék jellemzése a komplex minták proteolitikus emésztéséből felszabaduló peptidek analízise alapján történik. Shotgun proteomikának nevezzük, amikor a peptidkeveréket fragmentáljuk és HPLC-MS/MS-alapú fehérje azonosítást és kvantitatív elemzést végzünk. Ezt a módszert széles körben használják a fehérjék azonosítására, a proteom profilozásra, a fehérjék mennyiségi vizsgálatára, a fehérje módosítás felismerésére és a fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálatára. Egy másik stratégia, a „top-down” proteomika, amely a poszt-transzlációs módosítások meghatározására és a fehérje izoformák vizsgálatára biztosít lehetőséget.

A kétdimenziós gélelektroforézis (2-DE) egy standard, nagy felbontású módszer, amelyet a különböző típusú minták proteomikai változásainak vizsgálatára alkalmaznak. Ezzel vizsgálták többek között a retinát, az izom- és a kolorektális szöveteket, a Candida sejteket és a húst normális és patológiás körülmények között, illetve a gyógyszerek fehérje expresszióra gyakorolt hatását. A 2-DE legfontosabb előnyei a robusztusság, ez egy hatékony és széles körben alkalmazott módszer, amely lehetővé teszi a különböző körülményekre adott válasz során generált fehérjeprofilok összehasonlítását. Hozzájárul a fehérjék expressziós mintázatainak tanulmányozásához, amelyek betekintést nyújthatnak a fehérjék szabályozásába, funkciójába és kölcsönhatásaiba.

A tömegspektrometria (MS) egy fontos technika szinte minden proteomikai kísérlet esetében. Lehetővé teszi a fehérjék azonosítását és mennyiségi elemzését, valamint a fehérje-fehérje kölcsönhatások és a poszt-transzlációs módosítások vizsgálatát. Az MS hatékony analitikai technikaként elkülönítheti a gázfázisú ionokat tömeg-töltés (m/z) arányuk szerint, majd rögzíti az ionok relatív gyakoriságát. Ennek eredményeként a molekula tömegspektruma keletkezik. A tömegspektrométer három fő részből áll: ionforrásból, tömeg analizátorból és detektorból. A proteomikában a két leggyakrabban használt ionizációs technika a- mátrix segítette- lézer deszorpció/ionizáció (MALDI) és az elektropray ionizáció (ESI). A MALDI-t és az ESI-t lágy ionizációs technikáknak nevezik, mivel az ionizáció során csak az analit egy elhanyagolható mennyisége fragmentálódik. Mindkét technika alkalmas kis és nagy molekulák ionizációjára, valamint a fehérjék és peptidek analízisére. MALDI-MS-t alkalmaznak a viszonylag egyszerű peptid keverékek elemzésére, míg ESI-MS rendszert a komplex minták vizsgálatához.

2. Célkitűzések

1. A diszpáz által indukált vad típusú (WT) és TG2 knock-out (TG2KO) egerek PVR modelljének tanulmányozása kétdimenziós elektroforézis és tömegspektrometria segítségével annak érdekében, hogy információt kapjunk a PVR során bekövetkező fehérje profil változásról:

- diszpáz kezelés hatására megváltozott mennyiségű fehérjék azonosítása WT és TG2KO egerekben,
- fehérje profil változások vizsgálata TG2 hiányában,
- fehérje hálózatok változásának vizsgálata a PVR indukciója során WT és TG2KO egerekben.

2. A NET komponensek proteomikai analízise annak érdekében, hogy információt gyűjtsünk a NET fehérjék között jelen levő keresztkötések típusairól:

- klorinált poliaminok által létrehozott keresztkötések vizsgálata a NET fehérjék között
- TGázok által katalizált ϵ -(γ -glutamil)-lizin és a bisz- γ -glutamil-poliamin keresztkötések vizsgálata a NET fehérjék között,
- NET fehérjék és keresztkötések hálózatának vizsgálata 5-(biotinamido)-pentil-amin (BPNH₂) és spermin (SPM) kezelések hatására.

3. Módszerek

3.1 PVR állat modell

Minden állatkísérletet az állatok szemszerkezeti és látáskutatásban történő felhasználására vonatkozó ARVO nyilatkozat alapján végeztünk és a protokollokat a Debreceni Egyetem Állategészségügyi Bizottsága hagyta jóvá. 6 nőtény 4-6 hónapos vad típusú (WT) és 6 TG2KO egereket pentobarbitállal érzéstelenítettünk, illetve egy csepp 1%-os prokain-hidrokloridot kaptak helyi érzéstelenítésre és egy csepp tropikamidot az írisz kitágítására. A proteolitikus diszpáz enzimet intravitreálisan fecskendeztük a jobb szemekbe, ami egerekben PVR indukciót eredményezett. A kontroll állatok szemébe steril fiziológiás sóoldatot fecskendeztük. A PVR indukció megerősítése Stratus Optikai Koherencia tomográfia (OCT) segítségével történt. Mind a kontroll, mind pedig a diszpázzal kezelt egereket az injekciót követő 14. napon feláldoztuk, miután a PVR képződésének jeleit, mint például az epiretinális membrán és/vagy a retina leválás jelenlétét észlelték OCT vizsgálat segítségével.

3.2 Az üvegtestek előkészítése és a fehérjék tisztítása

Az egerek szemét kiműtötték, és miután eltávolították a lencsét és az ínhártya gallérral együtt a szaruhártyát, kivették az egerek üvegtestét. Az üvegtesteket lízis pufferrel feloldottuk és 5 percen át jéghideg vízfürdőben ultrahangos kezelésnek vetettük alá, majd 16,9 g-n 10 percig 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszókat LoBind Eppendorf csövekbe gyűjtöttük és Ready-Prep 2-D CleanUp kit (Bio-Rad) segítségével a gyártó protokollja alapján tisztítottuk. A precipitáció és a centrifugálás után a csapadékot beszárítottuk, majd 450 μ l rehidrááló pufferben oldottuk és azonnal felhasználtuk izoelektromos fókuszálásra (IEF).

Transzglutaminázok vizsgálata a proliferatív vitreoretinopátiában és a neutrofil extracelluláris csapda képződésében

3.3 Két dimenziós gélelektroforézis

Az üvegtesti minták a 2-DE-hez a következő csoportokból származtak: (1) diszpáz kezelt WT (WT PVR), (2) fiziológiás sóoldattal kezelt WT (WT Ctrl), (3) diszpáz kezelt TG2KO (TG2KO PVR) és (4) fiziológiás sóoldattal kezelt TG2KO (TG2KO Ctrl). Minden esetben három biológiai párhuzamossal dolgoztunk. A 24 cm-es immobilizált pH-gradiensű IPG (pH 3-10) sztripeket passzívan rehidráltunk az extrahált üvegtesti fehérjékkel, 20°C-on egy éjszakán át. Az IEF-et 300 V-on végeztük 3 órán át, majd a feszültséget fokozatosan 3500 V-ra emeltük 5 óra alatt, végül 18 órán át 3500 V-on tartottuk miközben az áramerősség 50 μ A/strip volt. Az IEF-et követően az IPG sztripeket 15 percen keresztül ekvilibráltuk, először 0,6% ditiotreitolt (DTT) (Bio-Rad) tartalmazó ekvilibráló oldatban, majd szintén 15 percig 1,2%-os jó-d-acetamidot (IAA) (Bio-Rad) tartalmazó ekvilibráló pufferben. A második dimenzió során a sztripeket 12% SDS-poliakrilamid gélek tetejére helyeztük és agarózzal (Bio-Rad) lezártuk. A 12 gél együtt, azonos körülmények között futtattuk 100 mA/gél áramerősséggel 24 órán keresztül a Protean Plus Dodeca Cell készülék (Bio-Rad) alkalmazásával, amíg a bróm-fenol kék elérte a gél alját. A géleket prefixáltuk, majd házilag készített RuBPS fluoreszcens festékkel festettük egy éjszakán át. A festés után a géleket mostuk és posztfixáltuk. A gélképeket Pharos FX Plus Molecular Imager (Bio-Rad) készülék segítségével beszkeneltük.

3.4 Képanalízis Delta2D szoftver segítségével

A beszkenelt gélképeket a Delta2D (Decodon) 4.4-es verziója segítségével vizsgáltuk, és az alábbiak szerint csoportosítottuk: (1) WT PVR, (2) WT Ctrl, (3) TG2KOPVR és (4) TG2KO Ctrl. Annak érdekében, hogy tanulmányozhassuk a csoportok közötti különbségeket három projektet hoztunk létre: az első projektben a WT Ctrl és WTPVR gél képeket, a második projektben a TG2KO Ctrl és TG2KOPVR gélképeket, míg a harmadik projektben a WTPVR és TG2KOPVR gélképeket hasonlítottuk össze.

Az egyes csoportokból származó fehérje foltokat a Delta2D szoftver pontos illesztési módjának protokollja és a „group warping strategy” stratégiája szerint illesztettük. Az „union” módot alkalmaztuk az egyesített gélkép létrehozására, amely tartalmazza az összes gélen lévő valamennyi foltot. A szoftver kiszámította a csoportok között az átlagos normalizált folt térfogatának „fold change” értékét, valamint megállapította a szignifikáns különbségeket Student t-próba segítségével. Azokat a foltokat tekintettük szignifikánsan eltérőnek, ahol a p érték $p < 0,05$ volt. A szignifikáns különbségeket mutató foltokat kivágtuk és MS vizsgálatnak vetettük alá.

3.5 Gélben emésztés

A gél darabokat 50%-os acetonitril tartalmú 25 mM ammónium-bikarbonát (pH = 8,5) oldattal festékmentesítettük, majd 20 mM DTT alkalmazásával 1 órán át 56°C-os hőmérsékleten végeztük redukálásukat. Ezt követően alkilálást végeztünk 55 mM IAA oldattal 45 percig, szobahőmérsékleten, sötétben, majd egy éjszakán át emésztettük a mintákat 100 ng stabilizált MS tisztaságú tripszinnel (ABSciex), 37°C-on. A reakciót tömény hangyasavval (FA) (VWR) leállítottuk, és a triptikus peptideket extraháltuk a gél darabokból, majd vákuum

koncentrátorban (Thermo Scientific) beszárítottuk. A mintákat 10 µl 1%-os FA oldatban visszaoldottuk és tömegspektrometria alapú fehérje azonosításra használtuk fel.

3.6 Fehérje azonosítás tömegspektrometria alkalmazásával

A fehérje azonosításához a peptideket Easy nLCII (Bruker) nanoHPLC-vel elválasztottuk egymástól. A kromatográfiás elválasztást 90 perces víz/acetonitril gradiens alkalmazásával végeztük, 300 nl/perc áramlási sebesség mellett. A peptid elegyet Zorbax 300SB-C18 sómentesítő oszlopra (5 mm x 0,3 mm, 5 µm részecskeméret, Agilent) vittük fel, majd az elválasztásukat 150 mm x 75 µm Zorbax 300SB-C18 analitikai oszlopon (300 Å pórusméret, 3,5 µm szemcseméret, Agilent) végeztük. Az A mozgófázis 0,1%-os FA-t tartalmazó LC-MS minőségű víz, míg a B mozgófázis 0,1%-os FA-t tartalmazó acetonitril volt. A elválasztás során a B fázis tartalmát 0%-ról 100%-ra növeltük 60 perc alatt, majd 10 percig 100%-on tartottuk. Ezt követően 0%-ra csökkentettük 2 perc alatt, végül 18 percig 0%-on tartottuk.

Az analitikai oszlopról eluált peptideket 4000 QTRAP (ABSciex) tömegspektrométeren elemeztük, amelyet az Analyst szoftver 1.4.2 (ABSciex) vezérelt. Pozitív ion módban vettük fel az MS/MS spektrumokat és információfüggő adatgyűjtő (IDA) módszert alkalmaztunk. Az első tömeg szkenn tartomány 400 - 1700 amu volt, majd nagy felbontású pásztázást alkalmaztunk a két legintenzívebb prekursor ion töltöttségi fokának meghatározására. A fehérjék azonosításához ütközés indukálta disszociációs spektrumokat rögzítettünk (100 - 1900 amu tartományban) 4000 amu/sec sebességgel és maximum 85 eV ütközési energiát alkalmaztunk. A ciklusidő 5,4 sec, a feszültség 2800 V, az segédgáz nyomása 50 psi, a szárító gáz nyomása 20 psi és az ionforrás hőmérséklete 70°C volt. A felvett MS/MS spektrumok alapján a fehérjéket ProteinPilot 4.5 szoftver (ABSciex) segítségével azonosítottuk az UniProtKB/Swiss-Prot adatbázis felhasználásával. A fehérje azonosításkor minimum kritérium volt, hogy fehérjénként legyen legalább két peptid legalább 95%-os konfidenciával. Azokban az esetekben, amikor a fehérje azonosítása a ProteinPilot 4.5 (ABSciex) szoftver alkalmazásával nem sikerült, MASCOT keresést hajtottunk végre az NCBI-nr adatbázis felhasználásával. A hasító enzim típusát tripszinnek állítottuk be és a kihagyott hasítási hely minden esetben legfeljebb 1 volt. A MASCOT keresés esetében a változó módosításokat a következőképpen határoztuk meg: metionin oxidáció és Cys karbamidometiláció, míg a ProteinPilot esetében a szoftver biológiai módosítások táblázatát alkalmaztuk.

3.7 A proteomikai változások funkcionális vizsgálata

A gén ontológia (GO) elemzést alkalmaztuk a szignifikánsan eltérő expressziót mutató fehérjék funkcionális analízisére. A GO szerinti biológiai folyamatot, molekuláris funkciót és celluláris lokalizációt a String 10.5 verzióval vizsgáltuk létrehozva a változó fehérjék hálózatát és a GO funkciók dúsulási táblázatát.

3.8 Neutrofilek izolálása humán vénás vérből

50 ml humán egészséges önkéntesektől származó vénás vért EDTA-t (BD, 367525) tartalmazó vákuumos csövekbe gyűjtöttünk. Az etikai engedélyt a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága hagyta jóvá (DEOEC RKEB / IKEB Prot. No. 2745-2008). A vért 15 percig 500 g-vel, szobahőmérsékleten centrifugáltunk annak érdekében, hogy a vérlemezkéket tartalmazó

Transzglutaminázok vizsgálata a proliferatív vitreoretinopátiában és a neutrofil extracelluláris csapda képződésében

plazmát eltávolítsuk. A sejteket átpipettáztuk 50 ml-es csőbe és 12 ml 3%-os dextrán (Pharmacocosmos, Dextran T500) tartalmú sóoldatot (0,22 µm-es szűrővel sterilizálva, TPP Spritzen) adtuk a sejtekhez.

Ezután a csövet 50 ml-re feltöltöttük sóoldattal, és szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk. Miután a vörösvértesteket tartalmazó lebegő habot eltávolítottuk, a fehérvérsejteket tartalmazó felülúszót összegyűjtöttük és 20 mM PBS-EDTA oldattal négyszeresére hígítottuk 15 ml-es csőben. A sejteket 7 percig 300 g-vel, szobahőmérsékleten centrifugáltuk. Miután a felülúszót eltávolítottuk, a pelletet 3 ml 20 mM PBS-EDTA-ban szuszpendáltuk, és a sejteket Histopaque gradientsre rétegeztük, majd 30 percig 300 g-vel, szobahőmérsékleten centrifugáltunk. A felülúszót eltávolítottuk, és a neutrofileket 50 ml-es csőbe gyűjtöttük, majd kétszer mostuk 50 ml 20 mM PBS-EDTA-val.

7 percig, szobahőmérsékleten végzett centrifugálás után, a maradék trombocitákat eltávolítottuk, és a sejteket 30 ml RPMI 1640 tápoldatban felvettük. A sejteket ismét 7 percig 300 g-vel, szobahőmérsékleten centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk, majd a sejtekhez 1 ml RPMI 1640 tápoldatot adtuk. A sejteket megszámloltuk, majd a NET-et indukáltunk és felhasználtuk fehérje izoláláshoz.

3.9 NET fehérjék tisztítása

2×10^6 neutrofil 4 ml RPMI 1640 tápoldatban 6 lyukú szövettenyésztő lemezre pipettáztunk. A neutrofileket RPMI 1640 tápoldattal, vagy 5-(biotinamido)-pentil-aminnal (BPNH₂), vagy sperminnel (SPM) előinkubáltuk, majd formil-mirisztil-acetáttal (PMA) 4 órán át, 37°C-on, 5%-os CO₂-on aktiváltuk. A tápoldat eltávolítása után minden lyukat alaposan átmostunk 1 ml friss és előmelegített proteáz inhibitor koktélt tartalmazó RPMI 1640 tápoldattal, és 10 percig inkubáltunk 37°C-on. A tápoldat ismételt eltávolítása után a képződött NET-eket 20 percig emésztettük 10 U/ml DNáz-1 enzimet (Worthington) tartalmazó, 1 ml friss RPMI tápoldatban és a mintákat 16,9 g-vel, 4°C-on centrifugáltuk. A fehérjék kicsapása érdekében 0,5 ml felülúszót összekevertünk 1,5 ml -20 °C-os acetonnal, és egy éjszakán át -20°C-on inkubáltuk. A mintákat 10,4 g-vel, 30 percig, 4 °C-on centrifugáltuk. Ezután a pelleteket 200 µl Laemmli pufferben szolubilizáltuk, és -70°C-on tároltuk további vizsgálatig.

3.10 SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

A NET minták fehérje koncentrációját Bradford módszerrel határoztuk meg. A vizsgálat során szarvasmarha szérum albumint alkalmaztunk standardként. Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis során 20 µg NET fehérjét választottunk el 12%-os poliakrilamid gélen, Mini Protean Tetra Cell készülék (Bio-Rad) segítségével. Az elektroforézist 1,5 órán át, 30 mA-es állandó áramerősséggel végeztük, és fehérje molekulatömeg markerként ProSieve™ fehérje létrát (Lonza) alkalmaztunk. A fehérje festést PageBlue™ fehérje festék oldattal (Thermo Fisher Scientific) végeztük, a géleket Pharos FX Plus Molecular Imager (Bio-Rad) készülékkel szkenneltük, és a gélkép elemzését QuantityOne szoftverrel (Bio-Rad) végeztük. Minden sáv esetében megvizsgáltuk a sávok intenzitását és a becsült molekulatömegeket.

3.11 A keresztkötött NET fehérjék MS/MS alapú tanulmányozása StavroX szoftver alkalmazásával

A NET fehérjék között létrejött lehetséges keresztkötések azonosítására StavroX 3.2.10 szoftvert alkalmaztunk. Az vizsgálathoz .mgf fájlformátumú MS/MS adatokat használtunk fel, melyek tartalmazták az összes felvett spektrum adatait. A korábban azonosított NET fehérjék aminosav szekvenciáit az UniProtKB adatbázisból importáltuk FASTA formátumban. A tripszin enzimatis hasítási helyeit C-terminális lizinnél és argininnél, illetve a hasítás gátlási helyét a prolinnál határoztuk meg. Megadtuk a változó módosításokat: a metionin oxidáció és a cisztein karbamido-metiláció. A spermint (SPM), a spermidint (SPD) és a putrescint (PUT) lehetséges keresztkötőkként alkalmaztuk a következő keresztkötések jelenlétének keresésekor: 1) Lys-poliamin-Lys keresztkötéseket 200 Da, 143 Da, illetve 86 Da tömegváltozással; 2) Lys-poliamin-Met keresztkötéseket 200 Da, 143 Da, illetve 86 Da tömegváltozással; 3) Gln-poliamin-Gln keresztkötéseket 166 Da, 109 Da, illetve 54 Da tömegváltozással és 4) Gln-Lys keresztkötéseket 17 Da tömegváltozással. A kiszámított tömegváltozásokat bevittük a szoftverbe és az ezeknek megfelelő MS/MS spektrumokat kerestünk. Az eredményeket manuálisan elemeztük, és azokat a találatokat fogadtuk el, ahol az azonosított keresztkötött fehérjék „score” értéke pozitív és legalább négy b- vagy y-ion sorozatot tartalmazott. A keresztkötött peptidek szekvenciáját és a keresztkötés helyét Excel fájlokba importáltuk, majd felhasználtuk a keresztkötött NET fehérjék hálózatának megjelenítésére.

4. Eredmények

4.1. Diszpáz kezelés indukálta PVR fehérjeinek jellemzése vad típusú (WT) egerekben

Diszpáz kezelt WT (C57/BL6) egereket alkalmaztunk a PVR patogenezisében részt vevő fehérjék tanulmányozására. 2-DE-t végeztünk az üvegtesti mintákon, mely három kontroll és három diszpáz kezelt WT egérből származtak. A géleket házi készítésű RuBPS festékkel festettük és a gélképeket Delta2D szoftverrel vizsgáltuk és elemeztük. A WTCtrl csoportot három gélképből hoztuk létre, melyek fiziológiás sóoldattal kezelt mintákból származtak, míg a WTPVR csoport szintén három gélképből állt, amelyeket a diszpázzal kezelt mintákból kaptunk. Létrehoztuk az úgynevezett „fused image” képet, amelyet az összes gélkép egymásra helyezésével kaptunk meg. Ezen a gélképen 698 foltot detektáltunk.

Minden gél esetében az összes folt intenzitását meghatároztuk és a csoportok közötti „fold change” értékeket kiszámoltuk. A 698 foltból 30 foltnak az intenzitása változott szignifikánsan ($p < 0,05$) a diszpáz kezelés hatására. Ezt a 30 foltot kivágtuk a gélből, tripszinnel emésztettük és HPLC-MS/MS alapú fehérje azonosítást végeztünk.

19 folt esetében különböző krisztallin formákat azonosítottunk. A 19 foltból 8 folt alfa-krisztallin A fehérje volt. Minden krisztallin forma mennyisége az alfa-krisztallin B kivételével csökkent. Az intracelluláris fehérjék expressziós szintje csökkent a diszpáz kezelt WT mintákban a fiziológiás sóoldattal kezelt mintákhoz képest.

A 11.-14., 16.-19., 22. és 24. foltok esetében több mint egy fehérjét azonosítottunk hasonló peptid számmal, melyek közel azonos mennyiségű fehérjére utaltak. Ilyen esetekben ezen fehérjék együttes hatása figyelhető meg, ezért nincs információnk az egyes fehérjék változásairól.

4.2 A diszpáz kezelés indukálta PVR fehérjék jellemzése TG2KO egerekben

Az egérmodellek alkalmasak fehérjék funkciójának vizsgálatára, mivel könnyen létrehozhatók KO állatok a fehérjét kódoló gén kiütésével. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy az egerek PVR modellje mennyiben alkalmas a TG2 fehérje PVR-ben betöltött szerepének tisztázására, diszpázt, valamint fiziológiás sóoldatot fecskendeztük a TG2KO állatok szemébe. A WTCtrl és WTPVR minták vizsgálatához használt stratégiát követtük a TG2KO minták esetében is. Az üvegtesti mintákat 2D elektroforézissel, majd fehérje festéssel és képelemzéssel vizsgáltuk. A fiziológiás sóoldattal kezelt TG2KO egerek szeméből származó gélképek egyikén kevesebb, mint 100 foltot lehetett kimutatni, ezért ezt a gélképet nem használtuk fel a további elemzésekhez. Így a TG2KOCtrl csoport két gélképből, míg a TG2KOPVR csoport három gélképből állt, melyekből egy „fused image” képet hoztunk létre.

Ezen a gélképen 866 foltot detektáltunk, melyekből 97 mutatott szignifikáns ($p < 0,05$) intenzitás különbséget a diszpáz kezelés hatására. 33 folt esetében a folt intenzitása emelkedett, míg a többi 64 folt esetében csökkent. Számos foltot lehetett detektálni a TG2KOPVR gélen a bázikus pH-jú és alacsonyabb molekula tömegű régióban. Az egyébként jó minőségű fehérje elválasztás ellenére ebben a régióban nagyon kevés folt látszott a fiziológiás sóoldattal kezelt minták esetében.

A szignifikánsan eltérő intenzitású foltokat kivágtuk, melyek közül 37 foltot azonosítottunk HLPC-MS/MS alapú vizsgálattal. A diszpáz kezelés hatására eltérő intenzitást mutatott foltok közül a legtöbb alfa-krisztallint tartalmazott, de ebben az esetben ezeknek a szintje emelkedett a kezelés hatására. A G-fehérje, a heterogén nukleáris ribonukleoprotein és a tubulin mennyisége csökkent diszpáz kezelés hatására, mely összhangban van a WT egerekben megfigyelt korábbi eredményekkel. A glikolitikus enzim glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz és laktát-dehidrogenáz, a citoszkeletális fehérjék, mint a beta-aktin szerű fehérje 2, valamint a rekoverin, peroxiredoxin 2, szerotranszferrin és alfa-2 makroglobulin mennyisége szintén csökkent. A béta-krisztallin A1, a ferritin könnyű és nehéz lánc és a grifin szintje nőtt a TG2KOPVR mintákban.

Amikor a WT és TG2KO egerekben a diszpáz kezelés hatására bekövetkező változásokat összehasonlítottuk, a vizsgált fehérjék közül négy változott meg mind a WT, mind a TG2KO egerekben. A béta-tubulin 5 szintje a diszpáz kezelés hatására csökkent, a TG2 jelenlététől függetlenül. A WT egerekben az alfa-krisztallin A, béta-krisztallin A1 és grifin szintje csökkent, míg a TG2KO egerekben növekedett a diszpáz kezelés hatására. Az alfa-krisztallin A esetében egy foltban megfigyeltük a fehérje mennyiségének csökkenését a diszpáz kezelt TG2KO egerekben.

4.3 A TG2 hiány hatása az egér üvegtesti fehérjéire a PVR kialakulása során

Azon fehérjéket tanulmányoztuk a WTPVR és TG2KOPVR gélképek összehasonlításával, melyek expressziója a TG2-től függ a PVR kialakulása során. A két csoport csak abban különbözött egymástól, hogy jelen volt vagy hiányzott a TG2. 41 folt mutatott szignifikánsan eltérő intenzitás változást.

15 fehérjét korábban azonosítottunk HLPC-MS/MS alkalmazásával, melyek közül 12 folt tartalmazott alfa- vagy beta-krisztallint, a többi három foltban pedig ferritin nehéz lánc, grifin illetve tubulin volt.

4.4 A diszpáz kezelés hatására eltérően expresszáldott fehérjék funkcionális elemzése

A diszpáz kezelés hatására szignifikáns változásokat mutató fehérjék hálózatát a String 10.4 segítségével hoztuk létre. A WT egerek esetében a hálózat 17 fehérjét és 14 lehetséges fehérje-fehérje kölcsönhatást tartalmazott. A feldúsult GO biológiai és molekuláris funkciók a szem fejlődése és a fehérjék kötése voltak, amik arra utalnak, hogy a PVR fejlődésében szerepet játszó fehérjék többsége hozzájárulhat a szem helyes fejlődéséhez és szerkezeti stabilitásához.

A TG2KO egerekben a szignifikánsan eltérő mennyiségű fehérjék hálózata 18 fehérjét és 24 fehérje-fehérje kölcsönhatást tartalmazott. A feldúsult GO biológiai és molekuláris funkciók aktív metabolikus- és homeosztatisztikus mechanizmusokra és Fe^{2+} kötése utaltak.

A TG2KOPVR csoportban a fehérjék többnyire extracelluláris régióban és vezikulákban lokalizálódtak, míg a WT egerek esetében főleg a mielin burokokban.

Összességében elmondható, hogy a PVR egér modelleket sikeresen alkalmaztuk a diszpáz által kiváltott PVR során megváltozott fehérjék vizsgálatára. Az eredményeink összhangban vannak az irodalmi adatokkal. A krisztallinok fehérje mennyiségében figyeltük meg a legnagyobb változásokat a diszpáz kezelés hatására. Elsőként mutattuk ki, hogy az üvegtestben emelkedik az alfa-krisztallin B fehérje szintje diszpáz kezelés során. Logikusnak tűnik, hogy a krisztallinok az üvegtestbe jutnak retinasérülést követően, ami gyakran megelőzi a PVR kialakulását. Megfigyeltük a krisztallin hálózat változását a diszpáz kezelt TG2KO egerekben. Annak ellenére, hogy a vizsgálat időpontjában hasonló állapotot mutattak, a WT PVR és TG2KO PVR egerekben eltérő krisztallin profil változást figyeltünk meg. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az egérben a krisztallinok profiljában több változás hozható összefüggésbe a PVR-rel. Figyelembe véve, hogy a diszpáz proteáz és a TG2 izopeptidkötést létrehozó keresztkötő enzim, érdekes lenne részletesebben megvizsgálni, hogyan változik a fehérje kifejeződése PVR során. Elképzelhető, hogy a proteáz rezisztens keresztkötések kialakulásának hiánya növeli a diszpáz általi krisztallin hasítást.

4.5 A különböző kezelések hatására létrejött neutrofil extracelluláris csapda összetevőinek proteomikai vizsgálata

Az izolált NET fehérjék profilját proteomikai megközelítéssel tanulmányoztuk. Három donortól származó Ctrl, BPNH₂-vel és SPM-mel kezelt mintákból 20 µg izolált fehérjét vizsgáltunk 12%-os SDS-poliakrilamid gélen.

Elvégeztük a Ctrl, a BPNH₂ és SPM kezelt NET minták gélkép elemzését. Az SDS-poliakrilamid gélen történő elválasztást követően egy jól reprodukálható fehérje sáv mintázatot figyeltünk meg. A BPNH₂ és SPM kezelés hatására a sávok intenzitásában változásokat tapasztaltunk, azonban ezek nem voltak szignifikánsan eltérőek.

A sávokat kivágtuk és HPLC-MS/MS alapú fehérje azonosítást végeztünk. 16 NET fehérjét azonosítottunk, melyek közül 14-et már publikáltak. A leukocita elasztáz inhibitor és az S100-A6 fehérjét még nem azonosították NET komponensként. Néhány fehérjét az elméleti

Transzglutaminázok vizsgálata a proliferatív vitreoretinopátiában és a neutrofil extracelluláris csapda képződésében

molekula tömegüknek megfelelő sávokban azonosítottunk, de sok közülük különböző pozíciókba vándorolt, ami extenzív fehérje processzási folyamatokra utalhat.

4.6 Klórozott poliaminok és transzglutamináz reakció által létrehozott poliamin mediált fehérje keresztkötések tanulmányozása

Az azonosított fehérjék között kialakult potenciális keresztkötések jelenlétének kimutatását az MS adatok elemzésével végeztük, a StavroX szoftver segítségével. Négy lehetséges keresztkötés jelenlétét tanulmányoztuk. Mieloperoxidáz (MPO) aktivitás hatására SPM, SPD és PUT klóraminok képződhetnek, a klóraminok reakcióba léphetnek a fehérjéhez kötött lizinekkal vagy metioninokkal, ami Lys-poliamin-Lys vagy Lys-poliamin-Met keresztkötéseket eredményez. A SPM, a SPD és a PUT TGáz által katalizált reakcióban a fehérjéhez kötött glutaminok között is kialakíthat keresztkötéseket. Ezenkívül a TGázok katalizálhatnak izopeptid kötéseket a fehérjéhez kötött Lys és Gln között, ezért a γ -Gln- ϵ -Lys keresztkötések jelenlétét is megvizsgáltuk.

Detektáltuk a klorinált poliamin beépüléssel létrejött bisz- ϵ -lizil-poliamin és ϵ -lizil-S-metionil-poliamin keresztkötéseket. Emellett bisz- γ -glutamil-poliamin, valamint ϵ -(γ -glutamil)-lizin keresztkötéseket is kimutattunk, amelyeket tipikusan a transzglutaminázok hoznak létre. A beépült klorinált SPM és SPD száma, hasonló vagy valamivel alacsonyabb volt a BPNH₂ kezelt mintákban, a PUT esetében pedig magasabb, míg az SPM-mel kezelt mintákban a vizsgált keresztkötéseknek a száma nőtt. Hasonló tendenciát figyeltünk meg a transzglutamináz által katalizált bisz- γ -glutamil-poliamin és az ϵ -(γ -glutamil)-lizin keresztkötések számában is.

Ezek az adatok azt mutatták, hogy mind a klóramin mediált, mind a TGáz mediált keresztkötések jelen voltak. A keresztkötött fehérjék hálózatát manuálisan ábrázoltuk és változásokat figyeltünk meg a különböző kezelések hatásának eredményeként.

Elmondhatjuk, hogy sikerült kimutatnunk, hogy a NET fehérjék közötti kovalens keresztkötések a funkcionális NET képződés szerves részeként stabilizálhatják a NET szerkezetét. Minden minta esetében a NET fehérjék mintázata jól reprodukálható volt, de a sávok fehérje összetétele eltérést mutatott. Az S100-A6 fehérjét és a leukocita elasztáz inhibítor új NET fehérjeként azonosítottunk MS analízissel. A sávokban számos, más molekulatömegnek megfelelő fehérjét azonosítottunk, ami a NET kialakulása során a fehérjék extenzív poszt-transzlációs módosítására utal. Ez feltehetően magában foglalja a keresztkötések kialakulását és a proteolízist. Bár a SPM és BPNH₂ kezelések nem okoztak szignifikáns változást a NET fehérjék mintázatában, de a sávokban lévő fehérjék összetételében eltérést tapasztaltunk, amely a NET kialakulásáért felelős biokémiai rendszerek robosztusságára utal. A kezelt NET mintákban kialakult fehérje keresztkötések MS/MS adatai alapján kimutattuk, hogy a klorinált poliaminok beépülnek a NET fehérjékbe és keresztkötéseket alakíthatnak ki a NET fehérjék között. Azt is megerősítettük, hogy mind a bisz(γ -glutamil)poliamin, mind az ϵ -(γ -glutamil)-lizin keresztkötések létrejöhetnek. Eredményeink azt mutatják, hogy mind az endogén kovalens poliamin konjugáció mind a NET fehérjék enzimátikus keresztkötése, a poliaminok, az MPO és a TGáz együttes jelenléte szükséges a NET stabilitásához és nélkülözhetetlenek a NET biológiai funkciójához.

5. Összefoglalás

A transzglutaminázok (TGázok) széles körben vizsgált Ca^{2+} -függő enzimek, melyek változatos funkciókkal rendelkeznek. Számos esszenciális fiziológiás és patológias folyamatban játszanak szerepet azért, hogy katalizálják az ϵ -(γ -glutamil)-lizin izopeptid kötések létrejöttét a lizin és glutamin aminosav oldalláncok között.

Munkám első felében az volt a célom, hogy egerek üvegtesti mintáiban kétdimenziós gélelektroforézis és tömegspektrometria alapú fehérje azonosítás alkalmazásával olyan fehérjéket azonosítsak, amelyek összefüggésben állnak a proliferatív vitreoretinopátiával (PVR). TG2 jelenlétében és hiányában egyaránt sikerült kimutatnom a PVR-hez köthető fehérjéket az egér üvegtesti mintákban. A diszpáz kezelés hatására a krisztallinok különböző formáinak mennyiségében figyeltem meg a legjelentősebb változásokat, mindemellett eltérő krisztallin profil változást tapasztaltam a vad típusú PVR és TG2 knock-out PVR csoportokban. Munkám során sikerrel alkalmaztam a kétdimenziós elektroforézist és a PVR egérmodellt a diszpáz által indukált PVR-re jellemző fehérje változások és a TG2 hiányában bekövetkező változások tanulmányozására. Eredményeim jó egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal, de további funkcionális vizsgálatok szükségesek a megfigyelt jelenség mögött húzódó molekuláris magyarázat felderítésére.

Munkám második felében az volt a célom, hogy megvizsgáljam a fehérje keresztkötéseket, illetve azt, hogy hogyan változik a fehérje keresztkötés-profil a neutrofil extracelluláris csapda (NET) képződés során 5-(biotinamido)-pentil-amin és spermin kezelések hatására. A NET fehérjéket elektroforézis és folyadék kromatográffal-kapcsolt tandem tömegspektrometriával tanulmányoztam 4000 QTRAP tömegspektrométeren. Az MS/MS adatok alapján a keletkezett keresztkötések helyét és típusát StavroX keresztkötött fehérje vizsgáló szoftver segítségével azonosítottam. A fehérje keresztkötés mintázatokban változásokat mutattam ki a kezelések hatására. Adataim alapján megállapítható, hogy a keresztkötött fehérje hálózat kialakításáért két folyamat felelős: a TGázok és az mieloperoxidáz (MPO) által katalizált folyamatok, amelyek poliamin klóraminok keresztkötését hozzák létre. Adataink azt mutatták, hogy az MPO és a TGázok együttes jelenléte szükséges a NET megfelelő stabilizációjához.

6. Kenézy élettudományi könyvtár által kibocsátott publikációs jegyzék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/335/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Márkus Bernadett

Neptun kód: GGSPAW

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Márkus, B.**, Pató, Z., Sarang, Z., Albert, R., Tózsér, J., Petrovski, G., Csósz, É.: The proteomic profile of a mouse model of proliferative vitreoretinopathy.
FEBS Open Bio. 7 (8), 1166-1177, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/2211-5463.12252>
IF: 2.143 (2016)
2. Csomós, K., Kristóf, E., **Márkus, B.**, Csomós, I., Kovács, G., Rotem, O., Hodrea, J., Bagoly, Z., Muszbek, L., Csósz, É., Fésüs, L.: Protein cross-linking by chlorinated polyamines and transglutamylation stabilizes neutrophil extracellular traps.
Cell Death Dis. 7 (8), e2332, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2016.200>
IF: 5.965





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

További közlemények

3. **Márkus, B.**, Szabó, K., Pfliegler, V. P., Petrényi, K., Boros, E., Pócsi, I., Tózsér, J., Csősz, É., Dombrádi, V.: Proteomic analysis of protein phosphatase Z1 from *Candida albicans*.
PLoS One. 12 (8), e0183176, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0183176>
IF: 2.806 (2016)
4. Csősz, É., Lábicsák, P., Kalló, G., **Márkus, B.**, Emri, M., Szabó, A., Tar, I., Tózsér, J., Kiss, C., Márton, I.: Proteomics investigation of OSCC-specific salivary biomarkers in a Hungarian population highlights the importance of identification of population-tailored biomarkers.
PLoS One. 12 (5), e0177282, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0177282>
IF: 2.806 (2016)
5. Csősz, É., Kalló, G., **Márkus, B.**, Deák, E., Csutak, A., Tózsér, J.: Quantitative body fluid proteomics in medicine: a focus on minimal invasiveness.
J. Proteomics. 153, 30-43, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.009>
IF: 3.914 (2016)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,634

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,108**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.10.26.



Transzglutaminázok vizsgálata a proliferatív vitreoretinopátiában és a neutrofil extracelluláris csapda képződésében

Előadások:

Bernadett Márkus, Endre Kristóf, István Csomós, György Kovács, László Fésüs, Éva Csősz, Investigation of the neutrophil extracellular trap patterns elicited by different stimuli, 10th Molecular, Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2017.

Márkus Bernadett, Lábiscsák Péter, Kalló Gergő, Emri Miklós, Csősz Éva és Márton Ildikó: Szájüregi laphámrák (OSCC) - specifikus biomarkerek azonosítása tömegspektrometriás és immunológiai módszerek segítségével a magyar populációban gyűjtött nyálmintákból, MTA DAB Genomika Proteomika Munkabizottság, Omikai Fórum, 2016.

Jakob Bernadett, Csősz Éva, Tőzsér József, Emri Miklós, Szabó Adrienn, Redl Pál, Tar Ildikó, Kövér Zsanett, Olasz Lajos, Molnár Gyöngyi, Piffkó József, Barabás Péter, Barabás József, Márton Ildikó: A magyar populációban alkalmazható szájüregi laphámrák-specifikus nyál biomarkerek azonosítása tömegspektrometriás és immunológiai módszerek segítségével, A Magyar Fogorvosok Egyesületének Árkövy Vándorgyűlése, Szeged, 2016.

Jakob Bernadett, Dr. Éva Csősz, Prof. Dr. Tőzsér József, Dr. Emri Miklós, Dr. Szabó Adrienn, Dr. Redl Pál, Dr. Tar Ildikó, Dr. Kövér Zsanett, Prof. Dr. Olasz Lajos, Dr. Molnár Gyöngyi, Prof. Dr. Piffkó József, Dr. Barabás Péter, Prof. Dr. Barabás József, Prof. Dr. Márton Ildikó: Fehérje alapú szájüregi laphámrák (OSCC) biomarkerek azonosítása az Észak-Alföldi régióban gyűjtött nyálmintákból, Debreceni Fogászati Napok, Debrecen, 2016.

Bernadett Jakob, Selected Reaction Monitoring (SRM)-based targeted proteomics method development for brain protein analysis, 9th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2016.

Bernadett Jakob, Analysis of the protein crosslink profile during Neutrophil Extracellular Trap formation, 8th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2015.

Poszter prezentációk:

Bernadett Márkus, Endre Kristóf, István Csomós, László Fésüs, Éva Csősz, Analysis of the protein crosslink-profile changes and the neutrophil extracellular trap patterns elicited by different stimuli, Transglutaminases in Medicine, Debrecen University Symposium, Debrecen, 2017.

Tímea Székely, Bernadett Márkus, Éva Csősz, László Fésüs, Update to TRANSDAB – a collection of transglutaminase substrates and interaction partners, Transglutaminases in Medicine, Debrecen University Symposium, Debrecen, 2017.

Bernadett Márkus, Krisztina Szabó, József Tőzsér, Éva Csősz, Viktor Dombrádi: Proteomic analysis of protein phosphatase Z1 functions in *Candida albicans*, Hungarian Molecular Life Sciences, Eger, 2017.

Tímea Székely, Bernadett Márkus, Éva Csősz, László Fesűs, TRANSDAB – Reloaded, 10th Molecular, Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2017.*

Eszter Deák, Gergő Kalló, Bernadett Jakob, Eszter Szalai, Éva Csősz, Adrienne Csutak: Alterations of tear proteins in patients with type 1 diabetes mellitus, 10th Central and Eastern European Proteomic Conference, Budapest, Magyarország, 2016.

Bernadett Jakob, Gergő Kalló, Péter Lábiscsák, Miklós Emri, Fera Mária, Ildikó Tar, Adrienn Szabó, Pál Redl, Éva Csősz, Ildikó Márton: Proteomics investigation of OSCC-specific salivary biomarkers in Hungarian population, 10th Central and Eastern European Proteomic Conference, Budapest, Magyarország, 2016.

Bernadett Jakob, Éva Csősz, Miklós Emri, Gergő Kalló, Ildikó Márton: Investigation of OSCC-specific salivary biomarkers in Hungarian population using targeted proteomics and immunological methods, 21st Congress of the European Association of Dental Public Health, Budapest, Magyarország, 2016.

Éva Csősz, Péter Lábiscsák, Bernadett Jakob, Gergő Kalló, Miklós Emri, Ildikó Tar, Mária Fera, József Tőzsér, Csongor Kiss and Ildikó Márton: Proteomics examination of OSCC-specific salivary biomarkers in a Hungarian population, Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése Szeged, Magyarország, 2016.

Bernadett Jakob, Endre Kristóf, Krisztián Csomós, László Fesűs and Éva Csősz: Analysis of changes in Neutrophil extracellular trap (NET) proteins profile using proteomic methods, 3rd FEBS3+ Meetings, Portoroz, Szlovénia, 2015.

Bernadett Jakob, Endre Kristóf, Krisztián Csomós, László Fesűs and Éva Csősz: Analysis of the protein crosslink-profile changes during Neutrophil Extracellular Trap formation, 33rd Informal Meeting on Mass Spectrometry, Szczyrk, Lengyelország, 2015.

Bernadett Jakob, Katalin Petrényi, József Tőzsér, Éva Csősz, Viktor Dombrádi: Revealing the functions of protein phosphatase Z1 in *Candida albicans* with proteomic methods, II. Life Sciences, Eger, 2015.

Zsuzsanna Pató, Bernadett Jakob, Réka Albert, Zsolt Sarang, Goran Petrovski, József Tőzsér, Éva Csősz: Analysis of proteins involved in proliferative vitreoretinopathy using proteomics methods, 8th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2015.

Jakob Bernadett, Pató Zsuzsanna, Petrovski Goran, Csősz Éva: A proliferatív vitreoretinopátiás (PVR) elváltozásra jellemző fehérje mintázatok tanulmányozása egér üvegtesti mintákban, Vaszkuláris és Kardiális Kutatóhálózat tudományos ülés, Debrecen, 2014.

Transzglutaminázok vizsgálata a proliferatív vitreoretinopátiában és a neutrofil extracelluláris csapda képződésében

Bernadett Jakob, Endre Kristóf, Krisztián Csomós, László Fésüs and Éva Csősz: The effect of different treatments on the characteristic of crosslinked proteins in Neutrophil Extracellular Trap, Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Debrecen, 2014.

Bernadett Jakob, Endre Kristóf, Krisztián Csomós, László Fésüs and Éva Csősz: Analysis of crosslinked proteins in Neutrophil Extracellular Trap,, 32nd Informal Meeting on Mass Spectrometry, Balatonszárszó, 2014.

7. Kulcsszavak

Transzglutaminázok, proliferatív vitreoretinopátia, neutrofil extracelluláris csapda, 2D gélelektroforézis, tömegspektrometria, poliaminok, keresztkötés

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Csősz Évának segítségével, útmutatásáért, melyek nélkül ez a dolgozat nem születhetett volna meg.

Köszönetemet fejezem ki Fésüs László és Tőzsér József professzor uraknak, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet korábbi és jelenlegi vezetőjének a lehetőségéért, hogy munkámat az intézet laboratóriumaiban végezhettem.

Hálás köszönetet mondok Fésüs László professzor úrnak és kutatócsoportjának, különösképpen köszönöm Dr. Kristóf Endre Károlynak és Dr. Csomós Krisztiánnak a neutrofilek izolálása és fertőzése során nyújtott segítségükért.

Köszönöm Dr. Goran Petrovskinak és munkatársainak, akik létrehozták a PVR egérmodelleket, hogy rendelkezésemre bocsátották a preparált üvegtesti mintákat.

Hálával tartozom advisoraimnak, Dr. Balajthy Zoltánnak és Dr. Scholtz Beátának, akik nyomon követték a kutatási eredményeimet és szakmai segítséget nyújtottak.

Szeretnék köszönetet mondani a Retrovirális Biokémia Laboratórium minden tagjának, a kutatásom során bemutatott előadások értékelésében szakmai segítséget nyújtottak.

Hálás vagyok a Proteomika Szolgáltató Laboratórium valamennyi korábbi és jelenlegi munkatársának a kutatásaim során nyújtott áldozatos és fáradhatatlan segítségéért, lelkesítéséért, különösképpen drága barátaimnak Dr. Kalló Gergőnek, Lábiscsák Péternek, Deák Eszternek, Sipos Beátának, Sólyom Kamillának, Székely Tímeának, Joóné Dr. Matúz Krisztinának és Pató Zsuzsannának.

Végül, a legnagyobb hálámat szeretném kifejezni férjemnek, kisfiamnak, családomnak és barátaimnak, akikre mindenben számíthattam ezen a kihívásokkal teli úton, és akik az életem minden szakaszában mellettem voltak segítő, támogató és bátorító szavaikkal, tetteikkel.