

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**GAZDASÁGI ÁLLATFAJOK VIZSGÁLATA PROTEOMIKAI
MÓDSZEREK ALKALMAZÁSÁVAL**

Gulyás Gabriella

Témavezető:
Dr. Jávor András
egyetemi tanár



DEBRECENI EGYETEM
Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2014.

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

Az elmúlt évtizedekben az állati eredetű termék előállításához kapcsolódó vizsgálatokban egyre inkább előtérbe kerültek a molekuláris biológiai kutatások, ezen belül is a genetikai információáramlás egyes lépcsőfokait jelentő makromolekulák (DNS, RNS, fehérje) tanulmányozása.

Viszonylag rövid idő alatt, nagy előrelépést sikerült elérni a genetikai információ megismerésének terén. Az ismeretanyag növekedésével számos új tudományág alakult ki, melyek már a posztgenomikai kutatások körébe tartoznak. Összefoglaló néven gyakran „omikák”-ként hivatkoznak rájuk, ide tartozik a metabolomika, transzkriptomika, glikomika és a proteomika is. Az „omikák” alapjaiban változtathatják meg az állattenyésztés gyakorlatát, hiszen figyelembe veszik a kívánatos fenotípus hátterében álló szabályozási hálózatokat és útvonalakat is.

A proteom, egy adott sejt, szövet, szerv vagy szervezet teljes fehérjekészletét jelenti egy adott időpontban. Működésének megértéséhez szükséges a fehérjék azonosítása és más molekulákkal való kölcsönhatásának megismerésére. A proteomika elsősorban azokkal a problémákkal foglalkozik, melyeket a DNS analízissel nem tudunk megoldani. Alkalmazása ez idáig a humán gyógyászatban és gyógyszerészetben terjedt el szélesebb körben.

Az állattenyésztésben jelenleg fiziológiai, immunológiai, szaporodásbiológiai, hús- és tejtermelés biológiai kísérletekben használják a proteomikai módszereket. Sejtek, sejtorganellek, szövetek és testfolyadékok fehérje expresszióját tudják nyomon követni a különböző kezelések során, ezzel lehetővé téve, a sejtekben lejátszódó több száz fehérje bonyolult kölcsönhatásának eredményeként kibontakozó folyamatok megértését. Nagy kihívást jelent a gazdasági állatfajok különböző szöveteinek proteom analízise, hiszen a fehérje összetételben mutatózó nagymértékű variabilitás megnehezíti az optimális mintatisztítási, frakcionálási és elválasztási módszerek kiválasztását.

Az állat fenotípusával, értékmérő tulajdonságával kapcsolatba hozható fehérje molekulák azonosítása és vizsgálata a továbbiakban a hatékonyabb termék előállítást segítheti.

Munkám során három proteomikai vizsgálat kivitelezését terveztem elvégezni. Az egyes kísérletekben kitűzött céljaim az alábbiak voltak:

1. vizsgálat: Házityúk máj proteomjának változása szelén indukció hatására

- optimalizált kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis protokoll kidolgozása a házityúk máj szövetére
- a szelén indukció hatására bekövetkező változások detektálása a csirkemáj fehérje összetételében
- összefüggések keresése a megváltozott expressziós szintet mutató fehérjék funkciója és a szelén élettani hatásai között

2. vizsgálat: Különböző genotípusú növendék kosok hosszú hátizom szövetének proteomikai elemzése

- optimalizált kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis protokoll kidolgozása a juh hosszú hátizom szövetére
- a két genotípus (cigája és merinó) között fehérje szinten fellépő különbségek detektálása
- az expressziós különbséget mutató fehérjék funkciójának megismerése és lehetséges szerepük feltárása a fajták között mutatkozó különbségek molekuláris hátterében

3. vizsgálat: Különböző élősúlyban levágott charolais bikák vázizom szövetének proteomikai vizsgálata

- optimalizált kétdimenziós differenciáló gélelektroforézis protokoll kidolgozása a szarvasmarha hosszú hátizom szövetére
- az 500 és 700 kg-os élősúlyban levágott charolais bikák vázizom proteomjának összehasonlítása, az expressziós különbséget mutató fehérjék azonosítása
- összefüggések keresése az azonosított fehérjék funkciója és a vizsgált tulajdonság között.

2. Házityúk máj proteomjának változása szelén indukció hatására

2. 1. A kutatás módszerei

A kísérletet Cobb 500 genotípusú broiler csirkékkel állítottuk be. A 12 kísérleti állatból két vizsgálati csoportot hoztunk létre, az egyik a kontroll (6 egyed), melynek takarmánykeverékében 0,2 mg/kg Se volt. A másik a kísérleti csoport (6 egyed), ahol a takarmány Se-koncentrációja 4,25 mg/kg volt. A mintagyűjtés 7 hét takarmányozást követően az állatok vágásakor történt. Orvosi szikével 0,5 g máj mintát gyűjtöttünk, melyet azonnal folyékony nitrogénbe helyeztünk.

A fehérjék elválasztására kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézist (2D-PAGE) alkalmaztunk. Az *1. táblázat* foglalja össze az optimalizálás során tesztelt beállításokat: a fehérje izolálás, az alkalmazott pH tartomány, a fehérjemennyiség, a rehidratáló pufferek, az izoelektromos fókuszálás kondíciói, a poliakrilamid gél koncentrációja és a festés esetén.

Az optimalizálást követően kiválasztottuk azokat a paramétereket, melyek segítségével a legtöbb egyedi fehérje foltot tudtuk elkülöníteni a csirkemáj minták poliakrilamid gélképein. Elvégeztük a két csoport (kontroll és szelénrel kezelt) mintáinak kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézisét, egyedenként három ismétlésben.

A gélképek szoftveres elemzését a Delta2D (Decodon TM GmbH, Germany) program segítségével végeztük el. A gélelemző szoftver által detektált, expressziós különbséget mutató fehérje foltokat kivágtuk a gélekből, a fehérjék azonosítása folyadék kromatográffal kapcsolt tömegspektrométerrel történt.

**1. táblázat: A 2D-PAGE során elvégzett optimalizálási lépések összefoglalása
csirkemáj minták esetén**

Fehérjék izolálása (lízis pufferek)	- 8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte - 8,5 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte - 8,5 M urea, 2 M thiourea 4% CHAPS, 60 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte + Cleanup Kit
Alkalmazott pH tartomány	pH 5-8 és pH 3-10
Fehérje mennyiség	20, 50, 100, 150, 300 µg
Rehidratáló puffer összetétele	- normál rehidratáló oldat: 8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte, 0,002% brómfenolkék - deStreak rehidratáló oldat: 8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 15 mg/ml DeStreak reagens, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte, 0,002% brómfenolkék
Izoelektromos fókuszálás kondíciói	Egy lépésben: 40000V 20000Vh Több lépésben: 1. lépés: 250V 15 perc 2. lépés: 4000V 2,5 óra 3. lépés: 4000V 20000 Vh
SDS poliakrilamid gél koncentrációja	10 %, 13 %, 15%
Festés módja	Coomassie G-250 és ezüst festés

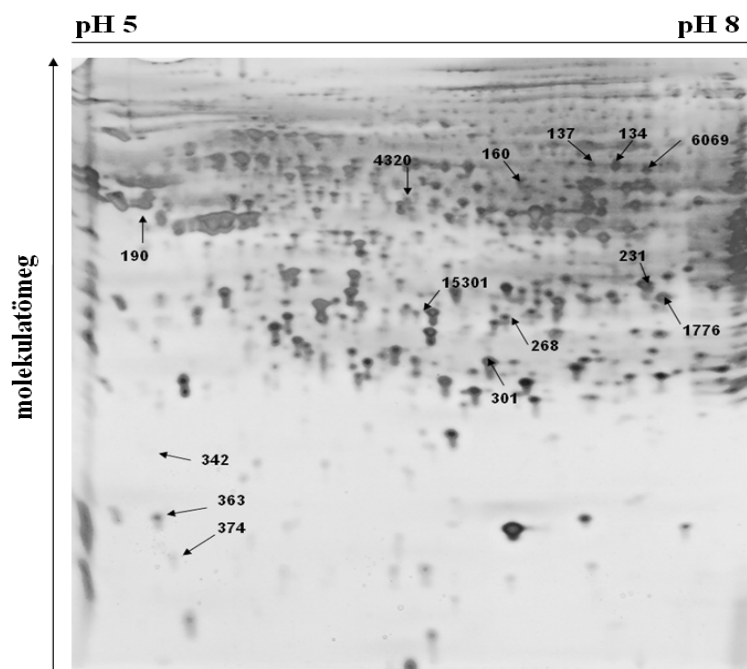
2. 2. Az értekezés főbb megállapításai

Vizsgálatunk során tesztelt beállítások eredményei alapján megállapítottuk, hogy az általunk használt paraméterek közül, melyek a legmegfelelőbbek csirkemáj minták kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézisének kivitelezéséhez (2. táblázat).

2. táblázat: Házityúk máj proteomjának kétdimenziós gélelektroforézise során alkalmazott ideális paraméterek összefoglalása

Fehérjék izolálása (lízis pufferek)	8,5 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte
Alkalmazott pH tartomány	pH 5-8
Fehérje mennyiség	150 µg
Rehidratáló puffer összetétele	DeStreak rehidratáló oldat: 8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 15 mg/ml DeStreak reagens, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte, 0,002% brómfenolkék
Izoelektromos fókuszálás kondíciói	Több lépésben
SDS poliakrilamid gél koncentrációja	13%
Festés módja	Coomassie G-250

A kontroll és a kezelt csoport mintáinak poliakrilamid gélképein átlagosan 708 (szórás: 44) fehérjefoltot detektáltunk. A 708 fehérjefolt közül, 18 folt intenzitásában tapasztaltunk szignifikáns különbséget ($p < 0,05$), ezek közül 14 fehérjét sikerült tömegspektrométerrel azonosítani (*1. ábra*). 8 spot intenzitása a kezelt csoportban volt nagyobb, míg 6 spot esetén a kontroll csoportban detektáltunk magasabb expressziós szintet (*3. táblázat*).



1. ábra: A házityúk máj szövetének 2D PAGE gélképe, a tömegspektrometriával azonosított fehérjék jelölve a gélen

3. táblázat: LC-MS módszerrel azonosított fehérjék, melyek a kontroll és a kezelt csoport között expressziós különbséget mutattak

Spot	Azonosított fehérje	Uniprot azonosító	Homológ fehérje vagy fehérje család	Azonosított peptidek száma/% szekvencia lefedettség ¹	Elméleti pI/Mw (Da) ²	Arány ³
134	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	P21642 (Gallus gallus)		13/26	6,6/67.311	0,5
137	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	P21642 (Gallus gallus)		22/49	6,6/67.311	0,6
160	Uncharacterized protein	E1C4W4 (Gallus gallus)	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase (Q2KJC9, Bos taurus)	15/38	7,0/58.053	2,3
190	Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed (Fragment)	F1N835 (Gallus gallus)		8/23	5,3/23.845	2,4
231	Uncharacterized protein (Fragment)	F1NFY2 (Gallus gallus)	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+], cytoplasmic (ROLM66, Anas platyrhynchos)	19/68	6,3/38.463	0,7
268	Proteasome subunit alpha type	F1NFI8 (Gallus gallus)		10/43	6,1/29.322	1,4
301	Peroxiredoxin-6	F1NBV0 (Gallus gallus)		14/66	6,0/25.076	1,2
342	RNA-binding protein 8A	Q9CWZ3 (Mus musculus)		1/7	5,8/19.888	0,5
363	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	Q09121 (Gallus gallus)		5/22	5,3/15.889	0,4
374	ADF actin binding protein	C7G537 (Gallus gallus)		6/51	5,3/16.106	4,8
1776	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	Q5ZME2 (Gallus gallus)		14/55	6,9/36.543	1,3
4320	Alpha-enolase	F1NZ78 (Gallus gallus)		16/49	6,4/47.333	1,7
6069	Uncharacterized protein (Fragment)	F1N8C3 (Gallus gallus)	acyl-CoA dehidrogenáz család	22/35	-	0,6
15301	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	E1C8D8 (Gallus gallus)		9/47	5,8/33.221	1,3

¹ Hány db peptidet azonosítottak a fehérjéből, és ezek hány százalékát fedik le a teljes szekvenciának

² Swissprot adatbázisban szereplő izoelektromos pont/molekulasúly értékek

³ A kontroll csoporthoz viszonyított arány a V% értékek alapján

Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a szelén csökkentette a glükoneogenesis intenzitását, hiszen a kezelt csoportban majdnem felére csökkent a foszfoenolpiruvát karboxikináz expressziója, mely képes a glükoneogenesis sebességét szabályozni (YANG és mtsai, 2009). A glükoneogenesis intenzitásának csökkenése összefüggésbe hozható a kezelt csoportban tapasztalt alfa enoláz szint emelkedéssel. Az alfa enoláz katalizálja a foszfoenolpiruvát szintézist a glikolízisben, mely a

foszfoenolpiruvát karboxikináz enzim által katalizált reakció végterméke is (PESHAVARIA és DAY, 1991). A szelén okozta foszfoenolpiruvát karboxikináz expresszió csökkenés a foszfoenolpiruvát mennyiségét is csökkentette, ennek ellensúlyozásaként emelkedhetett az alfa enoláz expressziójának mértéke.

Az alkalmazott kezelés a zsírsavak metabolizmusára is hatással lehetett. Ezt az alapján feltételezzük, hogy a glicerol-3-foszfát-dehidrogenáz enzim expressziós szintje lecsökkent a kezelt csoportban. A glicerol-3-foszfát-dehidrogenáz által katalizált reakció végterméke a glicerol-3-foszfát, melyhez a trigliceridek szintézisének egyik útvonalában az aktivált zsírsav kapcsolódik (HARDING és mtsai, 1975). Az enzim expressziójának csökkenése a végtermék mennyiségének csökkenését vonja maga után, mely a zsírsavak termelődésének intenzitását is csökkentheti. A zsírsav szint csökkenés hatással lehetett a zsírsavak lebontásának folyamatára is, ezt igazolni látszik, hogy a kezelt csoportban lecsökkent acetyl-coenzim A dehidrogenáz expressziót tapasztaltunk. Ez az enzim a zsírsavak béta-oxidációjának kezdeti lépését katalizálja, a béta-oxidáció a zsírsav lebontás egyik első lépése (THORPE és KIM, 1995).

A két csoport közötti legnagyobb expressziós különbséget a citoskeletális aktin és az ADF aktin kötő fehérjék esetén detektáltunk, ezek 2,4 illetve 4,8-szor magasabb expressziót mutattak az emelt szeléntartalmú takarmánnyal etetett csoport egyedeiben. Ezek alapján feltételezhető, hogy szelén hatására nő a citoskeletális aktin mennyisége és ezzel együtt az aktin szabályozását végző fehérje expressziója is. Az általunk alkalmazott magas szelén dózis miatt, a májsejtek nagyobb igénybevételnek lehettek kitéve. Ezért valószínűleg szükségessé vált, hogy a májsejtekben lejátszódó transzport- és jelátviteli folyamatok intenzitása növekedjen, mivel a citoskeletális aktin a transzport- és jelátviteli folyamatok kivitelezésében is kulcsfontosságú (SMALL és mtsai, 1999), így ez lehetett az oka az aktin fehérje jelentős expressziós növekedésének.

A kezelt csoportban három olyan enzim expressziója is megnövekedett, melyek az antioxidáns folyamatokban játszanak szerepet, bár ezek egyike sem a jól ismert szelén-dependens enzimek közé tartozik. Az „alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase” a lipid peroxidáció során keletkezett aldehideket metabolizálja (FONG és mtsai, 2006). A peroxiredoxin-6 redukálja a hidrogén-peroxidot, a rövid láncú zsírsavakat és a foszfolipid hidroxiperoxidokat (CHAE és mtsai, 1994). A „3-

mercaptopyruvate sulfurtransferase” fehérje a káros cianidot alakítja át és képes a szelén megkötésére és szállítására is (OGASAWARA és mtsai, 2005). A szelén élettani hatása ambivalens, hiányában betegségek alakulnak ki, túladagolása viszont mérgezést okozhat. Az általunk vizsgált kezelt csoport állatai esetén nem tapasztaltuk a mérgezés tüneteit, de ettől függetlenül az ilyen magas dózisban adagolt szelénnek (4,25 mg/kg szelén volt a kezelt csoport takarmánykeverékben, az Európai Unióban 0,5 mg/kg-ban maximalizálták a takarmánykeverékben alkalmazható mennyiséget) már lehetnek káros hatásai. A túlzott szelén bevitel károsíthatja az antioxidáns rendszert, a glutation-peroxidázok aktivitása csökken, a lipid peroxidációs folyamatok intenzitása viszont nő, mely nekrotikus szövetkárosodást is okozhat (sejtmembránok károsodása, enzim működés gátlása) (GAÁL, 1998; MÉZES és MATKOVICS, 1986). Valószínűleg az általunk végzett vizsgálatban is erről lehet szó, hiszen nem detektáltunk emelkedett glutation-peroxidáz expressziót, de a lipid peroxidáció termékeinek lebontását katalizáló enzimek expressziója megnőtt. Ezzel a káros folyamattal lehet összefüggésben a proteaszóma alfa típusú alegység fehérje expressziójának növekedése is a kezelt csoportban. A proteaszóma komplex a degradálódott fehérjék lebontását végzi (MURATA és mtsai, 2009), valószínűsítjük, hogy az antioxidáns rendszer károsodásával párhuzamosan számos fehérje is degradálódik.

3. Különböző genotípusú növendék kosok hosszú hátizom szövetének proteomikai elemzése

3. 1. A kutatás módszerei

Az összehasonlító vizsgálatba 10 növendék kost vontunk be, ebből 4 egyed szapora merinó és 6 egyed csókai cigája volt. A kosok azonos korúak voltak, hizlalásuk *ad libitum* takarmányozással történt, egy istállóban, kiscsoportos, mélyalmos tartás technológia mellett. Az állatokat átlagosan 4,5 hónapos korban, 40 kg-os élősúlynál vágtuk le. A mintavétel a juhok vágóhídi vágásakor történt, kivézetés után 20 percen belül, orvosi szikével a *longissimus dorsi* izom 12. és 13. borda közé eső területéről.

A fehérjék elválasztására kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézist (2D-PAGE) alkalmaztunk. Az 4. táblázat foglalja össze az optimalizálás során tesztelt beállításokat: a fehérje izolálás, az alkalmazott pH tartomány, a rehidratáló pufferek és az izoelektromos fókuszálás kondíciói esetén.

4. táblázat: A 2D-PAGE során elvégzett optimalizálási lépések összefoglalása juh hosszú hátizom minták esetén

Fehérjék izolálása (lízis pufferek)	- 8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte - 8,5 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 65 mM DTT, 40 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,8% 100X Bio-Lyte ampholyte
Alkalmazott pH tartomány	pH 5-8 és pH 3-10
Rehidratáló puffer összetétele	- normál rehidratáló oldat: 8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte, 0,002% brómfenolkék - DeStreak rehidratáló oldat: 8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 15 mg/ml DeStreak reagens, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte, 0,002% brómfenolkék
Izoelektromos fókuszálás kondíciói	Egy lépésben: 10000V 50000Vh Több lépésben: 1. lépés: 250V 20 perc 2. lépés: 10000V 2,5 óra 3. lépés: 10000V 50000Vh

Kiválasztottuk azokat a beállításokat, melyek segítségével a legtöbb egyedi fehérje foltot tudtuk elkülöníteni a juh hosszú hátizom minták poliakrilamid gélképein. Az optimális beállításokkal elvégeztük a két csoport (szapora merinó és csókai cigája) mintáinak kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézisét, egyedenként három ismétlésben.

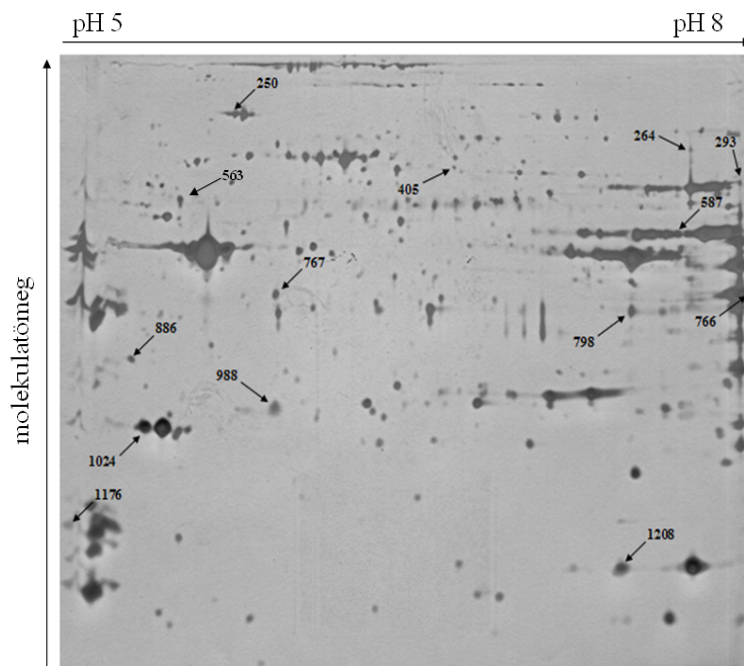
A gélképek szoftveres elemzését a Delta2D program segítségével végeztük. A gélelemző szoftver által detektált, expressziós különbséget mutató fehérje spotokat kivágtuk a gélekből, a fehérjék azonosítása folyadék kromatográffal kapcsolt tömegspektrométerrel történt.

3. 2. Az értekezés főbb megállapításai

Munkánk során megállapítottuk, hogy az általunk használt paraméterek közül, melyek a legmegfelelőbbek a juh hosszú hátizom minták kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézisének kivitelezéséhez (5. táblázat).

5. táblázat: Juh vázizom proteomjának kétdimenziós gélelektroforézise során alkalmazott ideális paraméterek összefoglalása

Fehérjék izolálása (lízis pufferek)	8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte
Alkalmazott pH tartomány	pH 5-8
Rehidratáló puffer összetétele	normál rehidratáló oldat: 8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte, 0,002% brómfenolkék
Izoelektromos fókuszálás kondíciói	Több lépésben



2. ábra: Juh *musculus longissimus dorsi* 2D PAGE gélképe, a tömegspektrometriával azonosított fehérjék jelölve a gélen

A szapora merinó és a cigája fajták hosszú hátizom szövetének összehasonlító proteomikai elemzése során átlagosan 315 (szórás: 32) fehérje foltot detektáltunk egy-egy gélen. A 315 fehérjefolt közül, 27 folt expressziójában tapasztaltunk eltérést. A 27

spot közül 14-et sikerült tömegspektrometriával azonosítanunk (2. ábra). 9 fehérje spot a szapora merinóban, 5 pedig a cigájában mutatott magasabb expressziós szintet ($p < 0.05$) (6. táblázat). Az azonosított fehérjéket funkciójuk alapján három csoportba soroltuk: struktúrfehérjék, szénhidrát metabolizmushoz köthető fehérjék és egyéb feladatot ellátó fehérjék.

6. táblázat: LC-MS módszerrel azonosított fehérjék, melyek a cigája és a szapora merinó fajták között expressziós különbséget mutattak

Spot	Azonosított fehérjék	Uniprot azonosító	Azonosított peptidek száma/% szekvencia lefedettség ¹	Elméleti pI/Mw ² (Da)	Arány ³
250	Alpha-actinin-3	Q0III9 (Bos taurus)	28/41	5,3/103.150	2,0
264	Aconitate hydratase, mitochondrial	P20004 (Bos taurus)	7/24	7,2/82.401	2,6
293	6-phosphofructokinase, muscle type	Q0IIG5 (Bos taurus)	3/16	8,6/85.162	0,4
405	Beta-enolase	Q3ZC09 (Bos taurus)	7/52	7,7/46.964	0,4
563	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	P00829 (Bos taurus)	55/78	5,0/51.563	6,5
587	Stress-induced-phosphoprotein	Q3ZBZ8 (Bos taurus)	3/15	6,1/62.481	1,6
766	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q28554 (Ovis aries)	8/67	7,8/34.731	0,5
767	Actin, alpha cardiac muscle	Q3ZC07 (Bos taurus)	8/45	5,2/41.784	1,4
798	Fructose-1,6-bisphosphatase	P09199 (Ovis aries)	7/44	6,1/36.544	0,7
886	Actin, cytoplasmic	P60713 (Ovis aries)	3/12	5,3/41.736	2,6
988	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	A0JNJ5 (Bos taurus)	3/49	5,0/20.800	2,3
1024	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	A0JNJ5 (Bos taurus)	8/66	5,0/20.800	1,3
1176	Fast skeletal myosin light chain	B9VGZ8 (Ovis aries)	3/27	4,9/19.102	2,3
1208	Myoglobin	P02190 (Ovis aries)	5/45	6,9/16.923	0,5

¹ Hány db peptidet azonosítottak a fehérjéből, és ezek hány százalékát fedik le a teljes szekvenciának

² Swissprot adatbázisban szereplő izoelektromos pont és molekulásúly értékek

³ Cigája csoporthoz viszonyított arány a V% értékek alapján

A vizsgálatunkba bevont két fajta között fehérje szinten fellépő különbségek hátterében, a különböző mértékű és irányú szelekciós nyomás állhat. Ebből a szempontból a cigája egy ősi fajtának tekinthető, mely nem volt kitéve olyan intenzív szelekciónak, mint a merinó, melyet kezdetben a gyapjú, majd a hústermelés irányába is erősen szelektáltak. Az általunk vizsgált szapora merinó pedig egy egészen új változatnak tekinthető a merinó fajtán belül, hiszen 1982-ben hozták létre magyar

merinó anyák és booroola merinó kosok keresztezéséből. Mindezek mellett a csókai cigája állomány egy időszakban szelekciós nyomásnak volt kitéve a tejtermelési mutatók javítása érdekében, ez az ellentétes irányú szelekció is okozhat különbséget a fehérje expresszióban.

Eredményeinkből látható, hogy az általunk azonosított struktúrfehérjék mindegyike a szapora merinó fajtában mutatott magasabb expressziós szintet. Nem csak az izom összehúzódásban szerepet játszó struktúrfehérjék (miozin könnyű lánc 1/3 fehérje, miozin könnyű lánc 2) expressziója emelkedett meg ebben a fajtában, hanem magának a sejtváznak a kialakításában szerepet játszó citoskeletális fehérjék (alfa-aktinin, béta-aktin) szintje is nőtt. A struktúrfehérjék emelkedett expressziója az intenzívebb fehérjebeépüléssel lehet összefüggésben.

A struktúrfehérjékkel ellentétben, a megemelkedett expressziós szintet mutató, szénhidrát metabolizmusban résztvevő fehérjéket nem lehet ilyen egyértelműen az egyik, vagy a másik fajtához kötni. A cigája fajtában a 6-foszfofruktokináz, a béta-enoláz, a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz és a fruktóz 1,6-biszfoszfátáz enzimek expressziós szintje volt magasabb, míg a szapora merinóban az akonitát hidratáz és az ATP szintáz béta-alegység fehérjék expressziója emelkedett meg.

A cigája fajtában magasabb expressziós szintet mutató fehérjék közül három a glikolízis egy-egy lépését katalizálja, míg a negyedik a glükoneogenezisben játszik szerepet és a fehérjék mindegyike a citoplazmában lokalizálódik. A glikolízishez kapcsolódó enzimek különböző mértékű expressziója az izmokban ill. húsookban régóta vitatott téma. Ez nagyrészt annak is köszönhető, hogy az izmokban természetes körülmények között nagy mennyiségben fordulnak elő. Leggyakrabban húsminőségi tulajdonságokkal hozzák összefüggésbe a glikolitikus enzimek expressziós változásait (SCHEFFLER és mtsai, 2007; LAVILLE és mtsai, 2007).

A merinó fajtában overexpresszálódott, szénhidrát metabolizmushoz köthető két fehérje a mitokondriumban lokalizálódik. Ezek a proteinek már nem a glikolízisben vesznek részt, hanem a citromsav-ciklusban, illetve a terminális oxidációban.

A szakirodalomban közölt fehérje markerek és az általunk azonosított expressziós különbséget mutató fehérjék összevetését követően, megállapíthatnánk, hogy a cigája fajta előnyösebb húsminőségi tulajdonságokkal rendelkezik, hiszen a glikolitikus enzimek és a mioglobin overexpressziója, valamint a stresszhez kapcsolódó fehérje alacsonyabb expressziója alapján erre következtethetnénk. Azonban a húsminőségi tulajdonságok műszeres vizsgálata nélkül nem vonhatunk le ilyen következtetést, hiszen az irodalomban közölt fehérje marker adatok más fajokra vonatkoznak. A jövőben érdemes lenne a szapora merinó és a cigája fajták műszeres húsminőségi vizsgálatát elvégezni és amennyiben azok az eredmények megfelelnek a kísérletünkben azonosított fehérjék alapján levont következtetéseknek, úgy ezek a proteinek a gyakorlatban is használható markerei lehetnének a húsminőségnek juhok esetén.

4. Különböző élősúlyban levágott charolais bikák vázizom szövetének proteomikai vizsgálata

4. 1. A kutatás módszerei

A vázizom szövet proteomikai vizsgálatának elvégzéséhez 10 charolais bikát vontunk be a kísérletünkbe. Ezek közül 5 állatot átlagosan 500 kg-os élősúlyban, 440 napos korban, míg 5 állatot átlagosan 700 kg-os élősúlyban, 540 napos korban vágtak le. A mintavétel az állatok vágásakor történt, orvosi szike segítségével 2 g-nyi mintát vágtunk ki a 12. és 13. borda közötti területről.

A fehérjék elválasztására kétdimenziós differenciáló gélelektroforézist (2D-DIGE) alkalmaztunk. Az 7. táblázat foglalja össze az optimalizálás során tesztelt beállításokat a fehérje izolálás, az alkalmazott pH tartomány, és az izoelektromos fókuszálás kondíciói esetén.

**7. táblázat: A 2D-DIGE során elvégzett optimalizálási lépések összefoglalása
szarvasmarha izomszövet esetén**

Fehérjék izolálása (lízis pufferek)	- 7 M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris - 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris, 10mM DTT - 8 M urea, 4% CHAPS, 30 mM Tris
Alkalmazott pH tartomány	pH 5-8 és pH 3-10
Izoelektromos fókuszálás kondíciói	Egy lépésben: 10000 V 50000 Vh Több lépésben: 1. lépés: 250 V 20 perc 2. lépés: 10000 V 2,5 óra 3. lépés: 10000 V 50000 Vh

Kiválasztottuk azokat a paramétereket, melyek segítségével a legtöbb egyedi fehérje foltot tudtuk elkülöníteni a szarvasmarha vázizom minták poliakrilamid gélképein. Az optimális beállításokkal elvégeztük a két csoport (500 és 700 kg) mintáinak kétdimenziós differenciáló gélelektroforézisét, egyedenként három ismétlésben.

A gélképek szoftveres elemzését a Delta2D program segítségével végeztük. A gélelemző szoftver által detektált, expressziós különbséget mutató fehérje spotokat kivágtuk a gélekből, a fehérjék azonosítása folyadék kromatográffal kapcsolt tömegspektrométerrel történt.

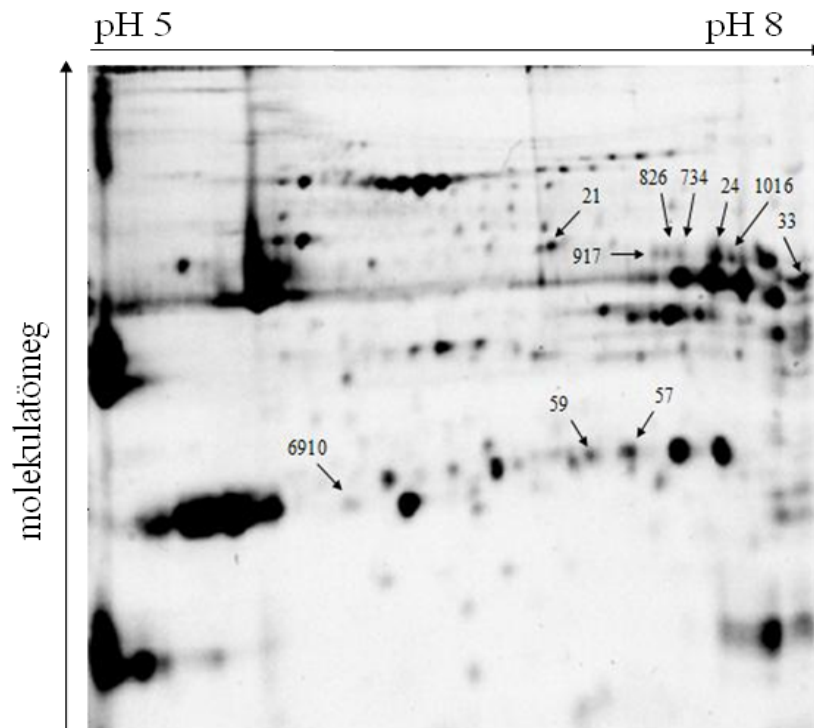
4. 2. Az értekezés főbb megállapításai

Munkánk során megállapítottuk, hogy az általunk használt paraméterek közül, melyek a legmegfelelőbbek a juh hosszú hátizom minták kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézisének kivitelezéséhez (8. táblázat).

**8. táblázat: Szarvasmarha vázizom proteomjának kétdimenziós differenciáló
gélelektroforézise során alkalmazott ideális paraméterek összefoglalás**

Fehérjék izolálása (lízis pufferek)	7 M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris
Alkalmazott pH tartomány	pH 5-8
Izoelektromos fókuszálás kondíciói	Több lépésben

Az 500 és a 700 kg-os élősúlyban levágott charolais bikák vázizom fehérjéinek elektroforézisét követően, átlagosan 362 fehérje spotot (szórás: 33) detektáltunk a géleken, pH 5-8-as tartományban. Tíz fehérje spot expressziójában találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között ($p < 0,05$) (3. ábra). Ezek közül kilenc fehérje folt a 700 kg-os csoportban mutatott magasabb expressziós szintet, míg egy fehérje intenzitása az 500 kg-os csoportban volt nagyobb (9. táblázat).



3. ábra: Szarvasmarha *musculus longissimus dorsi* 2D PAGE gélképe, az 500 és 700 kg-os csoport között expressziós különbséget mutató fehérjék jelölve

9. táblázat: LC-MS módszerrel azonosított fehérjék, melyek az 500 és 700 kg-os csoport között expressziós különbséget mutattak

Spot	Azonosított fehérjék	Uniprot azonosító	Azonosított peptidek száma/% szekvencia lefedettség ¹	Elméleti pI/Mw (Da) ²	Arány ³
21	Alpha-enolase	Q9XSJ4 (Bos taurus)	24/64	6,4/47.326	1,4
24	Beta-enolase	Q3ZC09 (Bos taurus)	5/20	7,6/47.096	1,9
33	Actin, alpha skeletal muscle e	P68138 (Bos taurus)	15/57	5,2/42.051	1,6
57	Triosephosphate isomerase	Q5E956 (Bos taurus)	9/49	6,3/26.690	1,7
59	Triosephosphate isomerase	Q5E956 (Bos taurus)	16/80	6,3/26.690	1,8
734	Beta-enolase	Q3ZC09 (Bos taurus)	10/23	7,6/47.096	2,2
826	Beta-enolase	Q3ZC09 (Bos taurus)	10/31	7,6/47.096	2,3
917	Beta-enolase	Q3ZC09 (Bos taurus)	15/51	7,6/47.096	2,2
1016	Beta-enolase	Q3ZC09 (Bos taurus)	3/13	7,6/47.096	1,8
6910	Heat shock protein beta-1	Q3T149 (Bos taurus)	9/70	6,0/22.393	0,4

¹ Hány db peptidet azonosítottak a fehérjéből, és ezek hány százalékát fedik le a teljes szekvenciának

² Swissprot adatbázisban szereplő értékek

³ Az 500 kg-os csoporthoz viszonyított arány a V% értékek alapján

A 24-es, 734-es, 826-os, 917-es és 1016-os spotok mindegyikében béta-enoláz fehérjét azonosítottunk, annak ellenére, hogy ezek a spotok öt különböző pI pozícióban helyezkedtek el a poliakrilamid géleken. Ez a heterogenitás valószínűleg egy poszt-transzlációs módosítás következménye, mely hatással lehetett a fehérjék töltésére. A fehérje adatbázisokban szarvasmarha faj esetén a béta-enoláz fehérje módosításait még nem közölték, így nem tudjuk pontosan megmondani, hogy melyik típusú módosításról van szó. Az enoláz enzimek a glikolízis utolsó előtti lépésében lejátszódó 2-foszfoglicerát - foszfoenolpiruvát konverziót katalizálják (PESHAVARIA és DAY, 1991). A béta-enoláz expressziós szintje jelentősen megnő az izmok postnatális fejlődése, növekedése során, ennek az az oka, hogy az energia metabolizmusban vesz részt, konkrétan a piruvát termelésben (PICARD és mtsai, 2010). A 700 kg-os csoport egyedeinél 1,8-2,2-szer nagyobb expressziót detektáltunk, mint az 500 kg-os állatoknál. Az irodalmi adatok alapján, más fajokban is ez a tendencia figyelhető meg. A béta-enoláz tehát bizonyítottan az idősebb állatokban expresszálódik magasabb szinten, ezzel jelezve a nagyobb glikolitikus aktivitást.

Az enolázok közül a béta-enolázon kívül a 21-es spotban azonosított alfa-enoláz is megnövekedett expressziós szintet mutatott a 700 kg-os csoport egyedeiben. Az alfa-

enoláz főleg az embrionális fejlődés korai stádiumában expresszálódik nagyobb mennyiségben, de a legtöbb kifejlett kori szövetben is jelen van (ZOMZELY és NEURATH, 1983).

Egy további fehérjét sikerült azonosítani, mely szintén a metabolikus fehérjék csoportjába tartozik. Ez a protein a triózfoszfát izomeráz, melyet két különböző pI pozícióban is azonosítottunk a géleken (57-es és 59-es spot). A fehérje adatbázisokban ezidáig kétféle poszt-transzlációs módosítást tettek közzé a triózfoszfát izomeráz esetén, ezek a foszforiláció és az acetiláció. Mindkét módosítás hatással van a fehérje izoelektromos pontjára, mégpedig csökkenti azt. Azonban ebben a tanulmányban nem volt célunk, hogy megállapítsuk, melyik módosítás felelős a különböző pI értékekért. Az 57-es spot esetén 70%-os, míg az 59-es spot esetén 80%-os expressziós növekedést detektáltunk a 700kg-os csoportban az 500kg-os csoporthoz képest. Az enzim fontos szerepet játszik az energiatermelésben, katalizálja a dihidroxi-aceton-foszfát és a D-gliceraldehid 3-foszfát reverzibilis átalakulását a glikolízis során (ALBERY és KNOWLES, 1976). Számos tanulmány számol be pozitív korrelációról különböző fajokban a triózfoszfát izomeráz szint és az életkor között (HOLLUNG és mtsai, 2009; KIM és mtsai, 2009; TELTATHUM és MEKCHAY, 2009). Ezek alapján megállapítható, hogy a triózfoszfát izomeráz fehérje expressziós változása valószínűleg kapcsolatba hozható az izomnövekedéssel.

A 33-as spotban azonosított protein a struktúrfehérjék csoportjába tartozik. Az alfa-aktin az egyik fő alkotója a kontraktilis rendszernek a vázizmokban. A charolais bikákban az alfa-aktin expressziója 1,6-szor volt nagyobb a 700 kg-os csoportban, mint az 500 kg-os csoportban. Szarvasmarháknál 14 és 18 hónapos kor között egy szignifikáns növekedési periódust figyeltek meg a rostok méretét tekintve (TE PAS és mtsai, 2004). Az általunk vizsgált két csoport életkora (440 és 540 naposak) körülbelül ennek a vizsgálati tartománynak a két szélső értékét képviseli, így belátható, hogy az izomrostok növekedése a kontraktilis aktin fehérjék expressziójának növekedésével is összefüggésben áll.

A Hsp27 (heat shock protein beta-1) hősokk fehérje (6910-es spot) az 500 kg-os csoportban mutatott expressziós szint növekedést. A Hsp27 a kis hősokk fehérjék családjába tartozik, a sejtekben betöltött legfontosabb funkciói közé a chaperon

aktivitás, az aktin sejtvázas szabályozása és az apoptózis ellenőrzése tartozik (GUSEV és mtsai, 2002). A hősokk fehérjék expressziós változását több kutatás is összefüggésbe hozta a húsok porhanyósságával. A Hsp27-nek számos izoformája létezik, az izoformák döntő többsége negatív korrelációban áll a porhanyóssággal, azonban néhányuk a porhanyósabb húsban expresszálódik nagyobb intenzitással, tehát pozitív korrelációt mutat (BERNARD és mtsai, 2007; KIM és mtsai, 2008; MORZEL és mtsai, 2008). Az általunk vizsgált két csoport húsminőségi paramétereinek műszeres vizsgálata nélkül nem tudunk korrelációt vonni a Hsp27 ezen izoformája és a porhanyósság között.

Összességében megállapítható, hogy a 700 kg-os csoport egyedeinél a nagyobb glikolitikus aktivitáshoz és izomnövekedéshez kapcsolódó fehérjék expressziója volt kifejezettebb. A jövőben érdemes lenne elvégezni a hízó bikák vázizomzatának proteomikai vizsgálatát egy szélesebb súly és életkor tartományban, mert a vizsgálatunkban szereplő két csoport csak a gyakorlatban leginkább előforduló növendék bika vágósúly tartományt fedte le.

Az általunk elvégzett három vizsgálat eredményei alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy a proteomikai módszerek alkalmasak komplex tulajdonságok vizsgálatára. Ugyan az állattenyésztésben még korlátozott a felhasználásuk, de az ismeretanyag növekedésével és a módszerek technikák fejlődésével párhuzamosan, egyre nagyobb igény mutatkozik a termelési, fiziológiai és patofiziológiai jelenségek mélyebb megértésére.

5. Új tudományos eredmények

A dolgozatomban szereplő vizsgálatok eredményei alapján az alábbi új tudományos eredmények fogalmazhatóak meg:

1. A kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis során az általunk tesztelt lízis és rehidratáló pufferek közül házityúk máj szövetre a 8,5 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte összetételű lízis puffer és a 8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 15 mg/ml DeStreak reagens, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte, 0,002% brómfenolkék összetételű rehidratáló puffer bizonyult a leghatékonyabbnak. Míg juh *m. longissimus dorsi* esetén a 8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte összetételű lízis puffer és ezzel megegyező összetételű rehidratáló puffer segítségével detektáltuk a legtöbb fehérje spotot a géleken. A szarvasmarha *m. longissimus dorsi* kétdimenziós differenciálós gélelektroforézise során az általunk tesztelt lízis pufferek közül a 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris összetételű puffer alkalmazásával detektáltuk a legtöbb egyedi fehérje foltot a géleken.

Mindhárom minta típus esetén a pH 5-8-as tartományt alkalmaztuk az izoelektromos fókuszálás során, mivel a fehérjék döntő többsége ebben a régióban helyezkedik el és a szűkebb pH tartomány használata növeli a poliakrilamid gélek felbontását. Az izoelektromos fókuszálás során alkalmazott feszültség beállítások közül, mindhárom minta típus esetén, a három lépésből álló fókuszálás volt hatékonyabb.

2. Az optimalizált paraméterek alkalmazásával pH 5-8-as tartományban házityúk máj szövet esetén gélenként átlagosan 708 (szórás: 44), juh hosszú hátizom szövet esetén gélenként átlagosan 315 (szórás: 32), szarvasmarha hosszú hátizom szövet esetén gélenként átlagosan 362 (szórás: 33) fehérje foltot lehet elemzésre felhasználni.
3. Nagy koncentrációjú szelén indukció hatására a házityúk máj proteomjában az „alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase”, a citoplazmatikus aktin, a proteaszóma alfa típusú alegység fehérje, az ADF aktin kötő fehérje, a peroxiredoxin 6, a citoplazmatikus malát dehidrogenáz, az alfa-enoláz és a 3-

merkaptopiruvát szulfurtranszferáz fehérjék expressziója emelkedett meg. Míg a foszfoenolpiruvát karboxikináz, a glicerol-3-foszfát-dehidrogenáz, az RNS-kötő fehérje 8A, az eukarióta transzlációs iniciációs faktor 5A-1 és az acetil-koenzim A dehidrogenáz fehérjék expressziója lecsökkent a kezelés hatására. Ezek alapján feltételezzük, hogy az alkalmazott szelén dózis csökkentette a glükoneogenezis és a zsírsav metabolizmus intenzitását, megnövelte a citoszkéletális aktin mennyiségét és ezzel együtt az aktin szabályozását végző fehérje expresszióját, valamint az antioxidáns rendszerre is hatással volt.

4. A szapora merinó és a csókai cigája juhajték hosszú hátizom szövetének proteomikai elemzése során megállapítottuk, hogy a miozin könnyű lánc 1/3, a miozin könnyű lánc 2, az alfa-aktinin, a béta-aktin, az akonitát hidratáz, a stressz-indukálta foszfoprotein és az ATP szintáz béta-alegység fehérjék expressziója a szapora merinó fajtában volt magasabb. Míg a 6-foszfofruktokináz, a béta-enoláz, a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz, a fruktóz 1,6-biszfoszfátáz és a mioglobin fehérjék expressziója a cigája fajtában volt kifejezettebb.

A struktúrfehérjék mindegyike a merinó fajtában mutatott magasabb expressziót, ez a jelenség az intenzív fehérjebeépüléssel lehet összefüggésben. A cigája fajtában a glikolitikus enzimek és a mioglobin overexpressziója, valamint a stresszhez kapcsolódó fehérje expressziós változása a húsminőségi tulajdonságokkal hozható összefüggésbe.

5. Az 500 és 700 kg-os élősúlyban levágott charolais hízó bikák vázizom szövetének proteomikai vizsgálata során megállapítottuk, hogy az alfa-enoláz, a béta-enoláz, a kontraktilis aktin és a triózfoszfát izomeráz fehérjék a 700 kg-os csoportban mutattak magasabb expressziós szintet, e fehérjék overexpressziója magas glikolitikus aktivitásra és erőteljesebb izomnövekedésre utal. Az 500 kg-os csoportban a Hsp27 hő sokk fehérje esetén detektáltunk magasabb expressziós szintet.

6. Az eredmények gyakorlati hasznosíthatósága

Az optimalizált fehérje izolálási eljárás és a kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis, illetve kétdimenziós differenciáló gélelektroforézis metodikák kidolgozása hozzájárul ahhoz, hogy a jövőben a házityúk máj szövet, ill. a juh és szarvasmarha hosszú hátizom szövet proteomikai elemzése egyszerűbbé, gyorsabbá váljon. A kifejlesztett módszerek várhatóan hozzájárulnak az említett fajokkal végzett biomarker azonosítási projektek eredményességéhez.

A házityúk májának proteomjában szelén indukció hatására bekövetkező fehérje-expressziós változások vizsgálatának eredményei rámutatnak arra, hogy a szelénre reagáló fehérjék, mely biokémiai útvonalak részét képezik, illetve elősegítik a májban lejátszódó folyamatok teljesebb megértését.

A juh fajta-összehasonlító és a különböző élősúlyban levágott szarvasmarhák proteomikai vizsgálata során azonosított fehérjék közül több is húsminőségi tulajdonságokkal hozható összefüggésbe. Ezek a fehérjék alkalmasak lehetnek biomarker molekuláknak, melyeket a gyakorlatban fel lehet használni arra, hogy expressziós változásaik alapján következtethessünk az adott húsminőségi tulajdonság megjelenésére.

7. A tézisben idézett irodalmak jegyzéke

1. Albery W. J. - Knowles J. R. (1976): Free-energy profile for the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, 15. 5627-5631.
2. Bernard C. - Cassar-Malek I - Cunff M. L. - Dubroeuq H. - Renand G. (2007): New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55. 5229–5237.
3. Fong W. P. – Cheng C. H. K. - Tang W. K. (2006): Antiquitin, a relatively unexplored member in the superfamily of aldehyde dehydrogenases with diversified physiological functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(24). 2881-2885.
4. Gaál T. (1998): Glutation peroxidázok. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 120. 160-164.
5. Gusev N. B. - Bogatcheva N. V. - Marston S. B. (2002): Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochemistry (Moscow)*, 67. 511–519.
6. Harding Jr. J. W. - Pyeritz E. A. - Copeland E. S. - Harold B. (1975): Role of glycerol 3-phosphate dehydrogenase in glyceride metabolism - effect of diet on enzyme activities in chicken liver. *Biochemical Journal*, 146. 223–229.
7. Hollung K. - Grove H. - Færgestad E. M. - Sidhu M. S. - Berg P. (2009): Comparison of muscle proteome profiles in pure breeds of Norwegian Landrace and Duroc at three different ages. *Meat Science*, 81. 487–492.
8. Kim N. K. - Cho S - Lee S. H. - Park H. R. - Lee C. S. (2008): Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. *Meat Science*, 80. 1068–1073.
9. Kim N. K. - Lee S. H. - Cho Y. M. - Son E. S. - Kim K. Y. - Lee C. S. - Yoon D. - Im S. K. - Oh S. J. - Park E. W. (2009): Proteome analysis of the m. longissimus dorsi between fattening stages in Hanwoo steer. *BMB reports*, 42. 433-438.
10. Laville E. - Sayd T. - Terlouw C. - Chambon C. - Damon M. - Larzul C. (2007): Comparison of sarcoplasmic proteomes between two groups of pig muscles selected for shear force of cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14). 5834–5841.
11. Mézes M. - Matkovics B. (1986): A lipidperoxidáció molekuláris mechanizmusa és mennyiségi mérése. In *A biológia aktuális problémái* 34. kötet, Szerk.: Csaba Gy., Medicina Könyvkiadó, Budapest, 61-104.
12. Morzel M. – Terlouw C. – Chambon C. – Micol D. – Picard B. (2008): Muscle pro-teome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Science*, 78. 297–304.
13. Murata S. – Yashiroda H. - Tanaka K. (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10. 104-115.
14. Ogasawara Y. – Lacourciere G. M. – Ishii K. – Stadtman T. C. (2005): Characterization of potential selenium-binding proteins in the selenophosphate

- synthetase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(4). 1012-1016.
15. Peshavaria M. - Day I. N. (1991): Molecular structure of the human muscle-specific enolase gene (ENO3). *Biochemical Journal*, 275. 427–433.
 16. Picard B. - Berri C. - Lefaucher L. - Molette C. - Sayd T. - Terlouw C. (2010): Skeletal muscle proteomics in livestock production. *Briefings in Functional Genomics*. 9. 259-278.
 17. Scheffler T. L. - Gerrard D. E. (2007): Mechanisms controlling pork quality development: the biochemistry controlling postmortem energy metabolism. *Meat Science*, 77. 7–16.
 18. Small J. V. – Rottner K. – Kaverina I. (1999): Functional design in the actin cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(1). 54–60.
 19. te Pas M. F. W. - Everts M. E. - Haagsman H. P. (szerk.) (2004): Muscle development of livestock animals: physiology, genetics, and meat quality. CABI, Cambridge, USA.
 20. Teltathum T. - Mekchay S. (2009): Proteome changes in Thai indigenous chicken muscle during growth period. *International Journal of Biological Sciences*, 5. 679-685.
 21. Thorpe C. - Kim J. J. (1995): Structure and mechanism of action of the acyl-CoA dehydrogenases. *FASEB Journal*, 9(9). 718–725.
 22. Yang J. - Satish C. K. – Hanson R. W (2009): What Is the Metabolic Role of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase? *Journal of Biological Chemistry*, 284. 27025-27029.
 23. Zomzely-Neurath C.E. (1983): Enolase. *Enzymes in the Nervous System*. In: *Handbook of Neurochemistry* 2nd Ed., Szerk.:Lajtha A., Plenum, New York, USA, 403-433.

7. Publikációs jegyzék

A dolgozat témájában megjelent publikációk:

Impakt faktoros folyóirat:

Gulyás G. - Czeglédi L. - Béri B. - Harangi S. - Csősz É. - Szabó Z. - Janáky T. - Jávor A.: Proteomic analysis of skeletal muscle at different live weights in charolais bulls. *Acta Alimentaria* (Befogadva, várható megjelenés: 2015. 01.) IF (2012): 0,475

Könyvrészlet:

Czeglédi L. - Pohóczky K. - **Gulyás G.** - Soltész B. - Jávor A. (2012): Proteome analysis of musculus longissimus dorsi of Hungarian Merino and Tsigai sheep breeds. In: P. Rodrigues, D. Eckersall and A. Almeida (eds.) *Farm Animal Proteomics*. 1-208. Wageningen Academic Press. (ISBN:978-90-8686-195-8). 123-126.

Lektorált folyóirat:

Czeglédi L. - **Gulyás G.** - Radácsi A. - Kusza Sz. - Békefi J. - Béri B. - Jávor A. (2010): Sample preparation and staining methods for two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins from animal tissues. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 43. 1. 267-270.

Gulyás G. - Czeglédi L. - Prokisch J.- Jávor A.(2012): Csirkemáj proteomjának változása szelén indukció hatására – 2D PAGE optimalizálás. *Acta Agraria Debreceniensis*, 2012/50. 9-13.

Gulyás G. - Béri B.- Jávor A. - Márk L. - Csősz É. - Pohóczky K. - Soltész B. - Kuti D. - Czeglédi L. (2012): Holstein-fríz tehenek hosszú hasznos élettartamának vizsgálata proteomikai módszerekkel. *Acta Agraria Debreceniensis*, 2012/48. 21-25.

Gulyás G. - Radócz T. - Jávor A. - Czeglédi L. (2013): Minta-előkészítési és frakcionálási lehetőségek a tojás proteomikai vizsgálata során. *Animal welfare, ethology and housing systems*, 9. 3. 153-159.

Gulyás G. – Jávor A. – Radócz T. – Simon Á. - Czeglédi L. (2014): A tojás proteomjának frakcionálása folyadék közegben az izoelektromos pont alapján. *Acta Agraria Debreceniensis*, 2014/57. 39-43.

Gulyás G. - Czeglédi L. – Prokisch J. – Csősz É. - Szabó Z. – Janáky T. – Jávor A.: Effect of selenium supplement on proteome of chicken egg white and yolk. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, (Befogadva, várható megjelenés: 2014. 12.)

Konferencia absztrakt:

Gulyás G. - Czeglédi L. - Keseru J. - Birko Zs. - Jávor A. (2010): 2D PAGE analyses of pig muscle membrane proteome. *Proteomic Workshop*. Aveiro, Portugal 31.

Czeglédi L. - **Gulyás G.** - Prokisch J. - Birkó Zs. - Keserű J. - Pohóczky K. - Jávora A. (2011): Selenium as Feed Supplement Changes Proteome of Chicken Liver. COST-Farm Animal Proteomics Spring Meeting 2011 39.

Gulyás G. - Jávora A. - Prokisch J. - Birkó Zs. - Keserű J. - Várszegi Zs. - Kuti D. - Czeglédi L. (2011): Effect of dietary selenium on protein expression profile of chicken liver. 5th CEEPC Prague 2011 99.

Gulyás G. - Czeglédi L. - Prokisch J. - Jávora A. (2011): Csirkemáj proteomjának változása szelén kiegészítés hatására. (Előzetes eredmények). I. Ag-Biotech Debrecen Konferencia. 2011. január 27., Debrecen. 22-23.

Gulyás G. - Radócz T. - Jávora A. - Czeglédi L. (2013): Minta-előkészítési és frakcionálási lehetőségek a tojás proteomikai vizsgálata során. Gödöllő, IV. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok 2013. október 24-26.

Nem a dolgozat témájában megjelent publikációk:

Impakt faktoros folyóirat:

Árnyasi M. - Komlósi I. - Kent M. P. - Czeglédi L. - **Gulyás G.** - Jávora A. (2013): Investigation of polymorphisms and association of the ABCG2 gene with milk production traits in sheep, *Livestock Science*, Volume 154, Issues 1–3, June 2013, Pages 64–68. IF (2012): 1,249

Lektorált folyóirat:

Soltész B. – **Gulyás G.** – Csikós Á. – Koncsos G. – Vass N. – Oláh J. – Jávora A. – Czeglédi L. (2012): Szarvasmarha és bivaly tej és tejtermékének elkülönítése DNS-alapú technika alkalmazásával. *Acta Agraria Debreceniensis*, 2012/49. 279-282.

Csikós Á. - Simon Á. – Tisza Á. – **Gulyás G.** – Jávora A. – Czeglédi L. (2014): PCR-TTGE módszer alkalmazása DNS mutációk kimutatására. *Acta Agraria Debreceniensis*, 2014/57. 21-27.

Konferencia absztrakt:

Tamas A.. - Szabadfi K. - Tarczai I. - Czeglédi L.. - **Gulyás G.** - Heronyanyi D. - Bilonka Zs. - Kiss P.- Gabriel R. - Helyes Zs. - Bagoly T. - Ertl T. - Gyarmati J. - Reglodi D. (2011): Examination of PACAP And PAC1-Receptors In the human milk and mammary gland of sheep. *Acta Physiologica*, Volume 202, Supplement 684. IF (2012): 4,382

Tamás A. - Szabadfi K. - Tarczai I. - Czeglédi L. - **Gulyás G.** – Heronyányi D. - Bilonka Zs. - Kiss P. - Gábriel R. - Helyes Zs. - Bagoly T. - Ertl T. - Gyarmati J. - Reglodi D. (2011): PACAP és PAC1-receptorok vizsgálata humán tejmintákban és juh emlőmirigy mintákban. FAMÉ konferencia, Pécs. 283.