

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A könny és verejték antimikrobiális fehérjéinek vizsgálata egészséges és patológiás állapotokban

Kalló Gergő

Témavezető: Dr. Csósz Éva



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2016

A könny és verejték antimikrobiális fehérjéinek vizsgálata egészséges és patológiás állapotokban

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

Írta: Kalló Gergő

Okleveles molekuláris biológus

Készült a

Debreceni Egyetem

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Csósz Éva

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora
Prof. Dr. Janáky Tamás, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Molekuláris Medicina Kutatóközpont
2016. június 30. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Bácsi Attila, PhD
Dr. Drahos László, PhD

A bíráló bizottság:

elnök: Prof. Dr. Biró Sándor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Janáky Tamás, az MTA doktora
Dr. Bácsi Attila, PhD
Dr. Drahos László, PhD
Dr. Katona Éva, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2016. november 29. 13.00 óra

1. Bevezetés

1.1. A kémiai barriert felépítő antimikrobiális és immunmodulátor fehérjék

Az emberi test minden olyan pontját, amely valamilyen formában kapcsolatba kerülhet a külvilággal egy specifikus kémiai barrier védi. A kémiai barriert alkotó antimikrobiális és immunmodulátor fehérjék (AMP-k) aktív módon védik a szervezetet a kórokozókval szemben. Az emberi test több ponton is kapcsolatba kerül a külvilággal; ilyen találkozási pontok a szem, a szájüreg, az orrüreg, a bőr, a tápcsatorna, valamint az urogenitális traktus. Testünk ezen részei kémiai barrierok által védettek, melyet az egyes testfolyadékok, úgy mint a könny, a nyál, az orrváladék, a verejték, a bél mukóza rétege és a vizelet szolgálnak.

A kémiai barrier alkotóit a különféle mirigyek és az epitél sejtek szekretálják. A testfolyadékokban található fehérjék többsége az immunrendszer részeként a védekezésben játszik szerepet. Az AMP-k vizsgálata során egyik csoportjukat, mint például a β -defenzineket, LL-37 katelicidint, dermcidint az antimikrobiális hatásuk alapján karakterizálták, ezeket prototípusos AMP-knek nevezzük. Más abundáns testfolyadék fehérjékről (például laktoferrin, lizozim-c, lakritin, lipokalinok stb.) a karakterizálásuk után derült ki, hogy antimikrobiális hatással is rendelkeznek. Az abundáns fehérjék koncentrációja jóval magasabb, mint a prototípusos AMP-ké és különféle védelmi funkciókat látnak el.

1.2 Az AMP-k, mint potenciális biomarkerek

A National Institute of Health (NIH) „Biomarker Definitions” munkacsoport definíciója szerint a biomarker egy olyan változó, amelynek mennyisége objektív módon mérhető, és az értéke alapján különbség tehető a normál biológiai folyamatok és a patológiás folyamatok között, vagy nyomon követhető a különféle terápiák során alkalmazott farmakonokra adott válasz. Néhány esetben olyan fehérjék tekinthetők biomarkernek, melyek központi szerepet játszanak a betegség kialakulásában, ezáltal ezen fehérjék egyben terápiás célpontként is szolgálhatnak. Más esetben a biomarkerek nem tekinthetők terápiás célpontnak, mivel ezen fehérjék változása a betegség következménye, nem pedig a kiváltó oka. Az elmúlt évek során a biomarker kutatások száma egyre inkább megemelkedett, melynek hatására több száz potenciális biomarkert azonosítottak különböző betegség típusokban.

A biomarker kutatások során az egyik leggyakrabban fellépő probléma az analizálható minták elérhetősége. Sok esetben az invazív mintagyűjtési lehetőség miatt nem nyerhető minta a betegséget érintő szövetből. A proteomikai és metabolomikai technikák fejlődése lehetővé tette fehérjék és metabolitok testfolyadékokban történő vizsgálatát is, melyek nem invazív módon gyűjthetők, ezáltal lehetőséget teremtve potenciális biomarkerek azonosítására a folyamatosan termelődő testfolyadékokból, mint például könny, nyál, verejték, orrváladék és vizelet.

Az egyes AMP-k eltérő koncentrációban találhatók meg a különböző barrierekben, így a kémiai barrieret egy jól meghatározott, úgynevezett AMP koktél alkotja, ami specifikus az egyes testfolyadékokra. Az AMP koktél összetétele az adott szövet érő hatásokra, vagy patológiás körülmények között megváltozik, így a testfolyadékokban található kémiai barrieret alkotó fehérjék változásának vizsgálata patológiás stimulus hatására a biomarker kutatások egyik fontos részét képezi.

1.3 A könny, a szem kémiai barrierre

A könny fehérjék, lipidek, metabolitok és egyéb szerves és szervetlen anyagok komplex rendszere, melynek elsődleges feladata a szem nedvesítése, tápanyagok szállítása, valamint a szem fénytörésének biztosítása. Emellett a szekretált AMP-k miatt a könny képezi a szem kémiai barrierjét, mely védelmet nyújt a patogénekkal szemben. A fő könnyfehérjék, mint a lizozim-c, laktoferrin, prolaktin indukált fehérje, lakritin stb. a veleszületett immunrendszer részeként védelmet biztosítanak. A könnyfehérjék többségét a könnymirigyek szekretálják, azonban egyes fehérjék epiteliális eredetűek, mint például a dermcidin és a defenzinek, míg mások a szérumból kerülnek a könnybe, mint a szérum albumin.

A könny egy folyamatosan termelődő, nem invazív módon gyűjthető testfolyadék, ami potenciális biomarker forrásként szolgálhat. A könny proteomjának változása új információkat szolgáltathat egyes szembetegségek, mint például száraz szem szindróma, blefaritisz, keratokónusz és diabéteszes retinopátia, patomechanizmusának megértésében; emellett alkalmas szisztémás elváltozások, mint például a szklerózis multiplex vizsgálatára is. Parkinson kórban szenvedő betegek könnymintáiban emelkedett TNF- α szintet mutattak ki, így a könny neurodegeneratív betegségek vizsgálatára is alkalmas lehet.

1.4 A verejték, a bőr kémiai barriere

A bőr a különféle kórokozók és környezeti hatásokkal szemben védelmet biztosít a szervezet számára. Az epitél sejtek fizikai barriere mellett a bőr felületén egy kémiai barrier is megtalálható, melyet az epitél sejtek, a keratinociták és a szebociták által szekretált AMP-k alkotnak. Ezek az AMP-k a verejtéssel kerülnek a bőr felületére. A könnyhöz hasonlóan a fő verejték fehérjék szintén az immunrendszer részét képezik; védelmet nyújtanak a kórokozókkal szemben, valamint részt vesznek a sebgyógyulási folyamatokban. Az AMP-k egy része konstitutív módon folyamatosan szekretálódik, míg más fehérjék expressziója patogén stimulus hatására indukálódik. A prototípusos AMP-k, mint a defenzinek, LL-37 katelicidin és dermcidin mellett a verejtékben lizozim-c-t és laktoferrint is azonosítottak.

A folyamatos szekréció és a nem invazív mintavételi mód miatt a verejték kiválóan alkalmazható a biomarker kutatásban. Cisztikus fibrózisban, atópiás dermatitiszben és ektodermális diszpláziában szenvedő betegek verejtékét analizálva kiderült, hogy a védekezésben és szöveti regenerációban résztvevő fehérjék szintje drámaian lecsökkent. Ugyanakkor szisztémás betegségekre jellemző biomarkerek azonosítására is felhasználták a verejték proteomjának vizsgálatát.

1.5 Az emésztőrendszer fizikai és kémiai barriere

A vékonybél mukóza rétege fontos fizikai és kémiai barrierként funkcionál és az immunrendszer részeként védelmet nyújt baktériumokkal, vírusokkal és egyéb mikroorganizmusokkal szemben. A szekretált AMP koktél részét képezi a minden testfolyadékban megtalálható lizozim-c és laktoferrin, de a fő alkotóelemei a prototípusos AMP-k, mint a β -defenzinek (hBD-k) vagy az LL-37 katelicidin. A vékonybél mukóza rétegében a hBD1 fehérjét konstitutívan expresszáló AMP-ként azonosították, melynek szintje gyulladásozó jel hatására nem indukálódik. A hBD4 fehérje szintje fertőzés hatására képes megemelkedni, viszont ez az indukció nem a klasszikus gyulladásozó mediátorok hatására következik be. A hBD2 és hBD3 fehérjék tipikusan az indukálható AMP-k közé tartoznak, gyulladásozó jel hatására a mennyiségük drámai mértékben képes megemelkedni. A gyulladásozó bélbetegségek az indukálható β -defenzinek szintjének emelkedését váltják ki, ami maga után vonja az epitél sejtek proliferációját, immunsejt aktivációt és gyulladásozó citokinek termelődését.

1.6 Selected Reaction Monitoring alapú célzott tömegspektrometria

A *Selected Reaction Monitoring* (SRM) a proteomikai kutatások egyik leggyakrabban alkalmazott célzott tömegspektrometriás módszere, mely a három kvadrupóllal rendelkező tömegspektrométerek egy speciális működési módja. Az első kvadrupól csak egy jól meghatározott prekursor iont enged bejutni a második kvadrupólba, ami ütközési cellaként szolgál. A képződött fragmens ionok közül a harmadik kvadrupól csak egy előre meghatározott iont enged át a detektorba, így a tömegspektrométer csak a kiválasztott prekursor ion és a hozzá tartozó kiválasztott fragmens ion együttes jelenléte esetén regisztrál jelet. A prekursor ion-fragmens ion párhoz tartozó m/z értékek, úgynevezett SRM átmenetek, beállítása biztosítja a módszer szelektivitását és specifikusságát. A görbe alatti terület (AUC) arányos a tömegspektrométerbe bejutott anyag mennyiségével, így a módszer kvantitatív vizsgálatokra is kiválóan alkalmazható.

Szemi-quantitatív módban az SRM módszer jól alkalmazható relatív kvantitálásra, azonban megfelelő beállításokkal abszolút kvantitálás is lehetséges. Fehérjék relatív kvantitálása során egyetlen peptid minimum két SRM átmenetének vizsgálata elegendő. Bizonyos esetekben, ahol a fehérjék abszolút kvantitálása szükséges, minimum három peptid szekvencia vizsgálata javasolt, szekvenciánként legalább öt SRM átmenetet monitorozva. Mind relatív, mind abszolút kvantitálásnál szükség van stabil izotóppal jelzett (SIL) referencia peptidek használatára, melyek belső standardként funkcionálnak az analízisek során. SRM mérés során a tömegspektrométer több száz átmenet egyidejű vizsgálatára képes, ezáltal több fehérje vizsgálatára is alkalmas ugyanazon mintából. Bár az antitest alapú módszerek nagyobb érzékenységet biztosítanak, az SRM mérési módszerek tágabb dinamikus tartománnyal rendelkeznek. Az SRM módszer érzékenységét különféle dúsítási technikák segítségével növelhetjük. A specificitás, az érzékenység, a tág dinamikus tartomány és a multiplex jelleg miatt az SRM módszer kiválóan alkalmazható fehérjék kvantitatív vizsgálatára kis mennyiségben rendelkezésre álló mintákban. Mivel az SRM méréshez előzetes információra van szükség a vizsgálandó fehérjékről, a módszer fő hátránya a fehérje specifikus peptidek limitált elérhetősége.

1.7 Jelölés nélküli kvantitálás

A jelölés nélküli kvantitálási módszer egy olyan tömegspektrometriás technika, ahol a prekursor ion intenzitása vagy az regisztrált MS/MS spektrumok száma alapján következtethetünk a tömegspektrométerbe jutott anyagok relatív mennyiségére. Az első esetben az AUC értékek alapján végezhető el a relatív kvantitálás, míg a második esetben a relatív kvantitálás a regisztrált MS/MS spektrumok száma és a tömegspektrométerbe bejutott anyagmennyiség közötti korreláción alapul. A nagy áteresztőképesség és pontosság, melyet a nagy felbontású analizátorral, többnyire Orbitrap-el vagy FTICR-el rendelkező tömegspektrométerek biztosítanak, lehetővé teszik akár nagyszámú minta vizsgálatát is. A módszer az egyidejű fehérje azonosítás és kvantitálás egyik legegyszerűbb módja, ezáltal a jelölés nélküli kvantitálás az egyik leggyakrabban alkalmazott úgynevezett „shotgun” proteomikai technika.

A módszer sokoldalúsága, a minta természetétől független alkalmazhatósága és hogy nincs szükség előzetes információra a vizsgálandó fehérjékről teszik jelentőssé az orvosi kutatásokban. A módszer hátránya, hogy egy nagyon stabil és jól beállított rendszert igényel, hogy elkerüljük a nem megfelelő kromatográfiai elválasztás során keletkező hibákat.

2. Célkitűzések

- SRM alapú célzott tömegspektrometriás módszer kifejlesztése humán β -defenzinek (hBD-k) relatív kvantitálására sejt kultúrákban és könny mintákban
- A kémiai barriert alkotó fehérjék tanulmányozása Alzheimer kóros betegek könny mintáiban potenciális könny biomarkerek azonosítása érdekében
- A kémiai barriert alkotó fehérjék tanulmányozása verejték mintákban és a fő verejtékfehérjék azonosítása

3. Módszerek

3.1 Sejttenyésztés

Sejtkultúrákon történő vizsgálatainkhoz különböző típusú humán adenokarcinóma eredetű HT-29, SW-1116 és Caco2 epitél sejteket használtunk. A HT-29 és SW-1116 sejtek 10% FCS tartalmú, míg a Caco2 sejtek 20% FCS tartalmú RPMI médiumban növekedtek. A médium 100 U/mL penicillint, 100 µg/ml sztreptomicint, 2 mM L-glutamint és 1% nem esszenciális aminosavat tartalmazott. A sejtek 5% CO₂-ban 37 °C-on inkubálódtak. A nyugvó sejteket (5×10^5 /ml) 10 ng/ml koncentrációjú IL-1 β citokin hozzáadásával aktiváltuk, majd a médiumot egy óra inkubáció után frissre cseréltük, melyet további 5 óra inkubáció követett. Az 5 óra elteltével a sejt felülúszót begyűjtöttük, majd tripszin-EDTA (Sigma) hozzáadásával a sejteket is begyűjtöttük. A felülúszóval történő szennyeződés elkerülése érdekében a sejteket kétszer mostuk PBS-el, majd lízis puffer hozzáadásával feltártuk a sejteket. A minták fehérje koncentrációját Bradford módszer segítségével határoztuk meg.

3.2 Könnyminta gyűjtés

A kutatás során 26 donortól gyűjtöttünk könnymintákat, 14 Alzheimer kóros betegtől, 9 korban és nemben illesztett kontrolloktól, valamint 3 fiatal egészséges önkéntestől. A mintagyűjtés a Helsinki deklaráció elvei szerint történt a Debreceni Egyetem által kiállított etikai engedély alapján (DEOEC RKEB/IKEB 2980–2009).

Az Alzheimer kór diagnózisának felállítását az NINCDS-ADRDA és a DSM-IV-TR kritériumok alapján pszichiáter végezte el. A pszichiátriai és neurológiai vizsgálatok mellett a betegek alap laboratóriumi vizsgálatokon estek át, valamint CT vagy MR vizsgálatok segítségével kizártuk a lehetőségét más típusú demencia fennállásának.

A korban és nemben illesztett kontroll önkéntesek részletes demográfiai, alkoholfogyasztási és gyógyszereszedési adatok, valamint a Mini-Mental teszt alapján kerültek beválogatásra. Kontrollként csak azok az önkéntesek kerültek beválogatásra, akik a demencia semmilyen jelét nem mutatták. Szisztémás gyulladásban, autoimmun betegségben szenvedők, valamint szemészeti problémával rendelkező egyéneket kizártuk a vizsgálatokból.

A könny mintavétel standard kapilláris technikával történt irritáció és stimuláció nélkül. A könnyminták centrifugálása után a felülúszóból Bradford reagens segítségével meghatároztuk a minták fehérje koncentrációját. A mintákat az analízisek kezdetéig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

3.3 Verejtékminta gyűjtés

A verejtékminták gyűjtése tíz férfi és tíz női egészséges önkéntestől történt a Helsinkii deklaráció elvei szerint, a Debreceni Egyetem etikai bizottsága által kiállított engedély alapján DEOEC RKEB/IKEB 4078/2013 és 2885/2008). A verejték gyűjtése 80°C -os szaunában történt. Az önkéntesek a mintagyűjtés napján semmilyen kozmetikumot nem használtak, a szaunába tiszta és száraz bőrrel léptek. Az önkéntesek 20 percet töltöttek a szaunában, majd csapvizess zuhanyzás utáni 10 perces szünetet követően újabb 20 percet töltöttek a szaunában.

A minták 30 percen belül jégen kerültek a laboratóriumba, ahol centrifugálást követően a felülúszók poolozása és koncentrálása történt. A beszárított mintákat 0,1 M ammónium-bikarbonát pufferben (pH 7,8) oldottuk vissza, majd Bradford módszer segítségével meghatároztuk a minták fehérje koncentrációját. A verejték mintákat hatszoros térfogatú -20°C -os acetonnal tisztítottuk, majd a csapadékot 0,1 M ammónium-bikarbonát pufferben (pH 7,8) oldottuk vissza. A visszaoldott csapadékból BCA módszer segítségével meghatároztuk a minták fehérje koncentrációját.

3.4 ELISA

A hBD2 fehérje mennyiségének könnyből történő meghatározására a Phoenix Pharmaceuticals Inc. szendvics ELISA kitjét használtuk (EK-072-37) a gyártó által javasolt protokoll szerint. A kísérleteket triplikátumban végeztük el $5\text{ }\mu\text{g}$ mennyiségű fehérjét tartalmazó mintákon.

3.5 SDS-PAGE

Három véletlenszerűen kiválasztott Alzheimer kóros betegtől származó könnyminta és két véletlenszerűen kiválasztott kontroll könnyminta $20\text{-}20\text{ }\mu\text{g}$ fehérjének megfelelő mennyiségét 10 % SDS poliakrilamid gélen szeparáltunk 100 V konstans feszültséggel egy órán keresztül. A sávok láthatóvá tételéhez Coomassie PageBlue (Fermentas) festéket használtunk, majd a gél Phoros FX Plus szkener (Bio-Rad) segítségével dokumentáltuk. A QuantityOne szoftver (Bio-

Rad) segítségével meghatároztuk a sávok intenzitását, majd az adatokat Mann-Whitney U teszttel analizáltuk a SigmaPlot 10.2 szoftver segítségével.

3.6 Könnyfehérjék LC-MS/MS alapú azonosítása

A szignifikáns intenzitáskülönbséget mutató sávokat kivágtuk, majd tripszinnel megemésztettük. Első lépésként 20 mM ditiotreitolt (Bio-Rad) segítségével redukáltuk a mintákat, majd 55 mM jódacetamid (Bio-Rad) hozzáadásával alkiláltuk a fehérjéket. A tripszines emésztést MS tisztaságú TPCK kezelt szarvasmarha tripszinnel (ABSciex) végeztük 37°C-on egy éjszakán át. Az emésztett peptideket extraháltuk, majd liofilizálás után 10 µl 1% hangyasav oldatban feloldva előkészítettük az LC-MS/MS analízisre.

A tömegspektrometriás analízis előtt a peptideket Zorbax 300SB-C18 oszlopon (5 × 0,3 mm, 5 µm pórusméret; Agilent) sómentesítettük, melyet egy 300SB-C18 analitikai oszlopon (150 mm × 75 µm 3,5 µm pórusméret; Agilent) történő elválasztás követett 90 perces gradienst alkalmazva. A gradiens során a szerves oldószer (B puffer) mennyiségét 60 perc alatt emeltük 0%-ról 100%-ra. A kromatográfiás elválasztás EasynLC II HPLC készüléken (Bruker) történt. Az A puffer 0,1% hangyasav tartalmú LC víz, a B puffer 0,1% hangyasav tartalmú LC acetonitril volt. Az alkalmazott áramlási sebesség 300 nl/perc volt.

A tömegspektrometriás méréseket pozitív LC-MS/MS módban végeztük 4000 QTRAP (ABSciex) tömegspektrométeren, NanoSpray II MicroIon ionforrás segítségével. A rendszert az Analyst szoftver 1.4.2 verziójával (ABSciex) működtettük. Az ionforrásra kapcsolt feszültség 2800 V volt, az ion source gas értéke 50 psi, a curtain gas értéke 20 psi, a forrás hőmérséklete pedig 70°C volt. Az analízis kivitelezésére információfüggő adatgyűjtési módot alkalmaztunk. Az első pásztázás után a két legintenzívebb csúcs töltöttségi fokának megállapítására „Enhancer Resolution” vizsgálatot végeztük, majd a töltöttségi fok alapján számolt energiával a csúcsokhoz tartozó peptideket ütközés indukálta disszociáció (CID) segítségével fragmentáltuk, ezután „Enhanced Product Ion” módban regisztráltuk az MS/MS spektrumokat.

Az MS/MS adatokból a ProteinPilot 4.0 szoftver (ABSciex) segítségével azonosítottuk a mintákban jelenlévő fehérjéket. Az azonosításhoz a SwissProt adatbázis 2015. júliusban elérhető verzióját használtuk, mely 548872 entry-t tartalmazott. Az azonosítás során felhasználtuk a szoftver által tartalmazott biológiai módosításokat, az azonosítás kritériuma minimum két $\geq 95\%$ konfidencia értékű peptid jelenléte volt.

3.7 Jelölés nélküli kvantitálás (LC-MS^E) és LC-MS/MS alapú fehérje azonosítás verejték mintákból

A jelölés nélküli kvantitálás és a verejték LC-MS/MS analízise az Arizónai Egyetem Toxikológiai központjában történt. 4,2 µg verejték minták redukálása, alkilálása, majd egy éjszakán át 37°C-on történő tripszines emésztése után 600 ng emésztett verejték minta és 50 ng emésztett T33V *Rhodobacter capsulatus* citokróm c belső standard került LC-MS^E analízisre. A belső standard hozzáadása a mintákhoz közvetlenül az analízisek előtt történt. A minták NanoAcquity UPLC (Waters) készülékhez kapcsolt Waters QTOF Premier tömegspektrométerrel kerültek elemzésre triplikátumban. A kromatográfiás elválasztás Symmetry C18 előtét oszlop (20 mm x 180 µm, 5 µm pórusméret; Waters) és BEH130 C18 analitikai oszlop (100 mm x 100 µm, 1,7 µm pórusméret; Waters) használatával történt. Az A puffer 0,1% hangyasav tartalmú LC víz, míg a B puffer 0,1% hangyasav tartalmú LC acetonitril volt. A peptidek megfelelő elválasztásához a B oldat mennyisége 150 perc alatt emelkedett 2%-ról 35%-ra, majd 2 perc alatt 95%-ra. A B oldat mennyisége 5 percen keresztül 95% volt, majd 2 perc alatt lecsökkent a kiindulási 2%-ra. Az áramlási sebesség 750 nl/perc volt, az oszlop hőmérséklete pedig 35°C. Az LC-MS adatok alacsony és magas energiájú MS módokban kerültek regisztrálásra.

Az emésztett verejtek minták analízise LC-MS/MS módszerrel is megtörtént LTQ Orbitrap Velos tömegspektrométeren (Thermo Fisher Scientific), amely Advion nanomate ESI ionforrással (Advion) üzemelt. A verejték mintákból ZipTip (Millipore) tisztítás után 240 ng minta került elemzésre. A tömegspektrometriás elemzés előtt az emésztett verejték minták C18 előtét oszlop (2 cm x 100 µm, 5 µm pórusméret; Thermo Fisher Scientific) és C18 analitikai oszlop (10 cm x 75 µm, 3 µm pórusméret; Thermo Fisher Scientific) alkalmazásával kerültek elválasztásra. Az elválasztás során a B oldat mennyisége 5 percig 5% volt, majd 5 perc alatt 10%-ra emelkedett, melyet 35 perces 35%-ra emelés követett. Ezután a B puffer aránya 20 perc alatt 50%-ra, majd 5 perc alatt 95%-ra emelkedett, ami 4,6 percig 95% maradt. Az áramlási sebesség 400 nl/perc volt. Az információfüggő adatgyűjtés az Xcalibur v 2.1.0 szoftver (Thermo Fisher Scientific) segítségével történt; az Orbitrap analizátorban előzetes pásztázás során a 14 legintenzívebb csúcs került meghatározásra, melyek CID spektrumai a lineáris ionscaba használatával kerültek regisztrálásra.

3.8 LC-MS^E és LC-MS/MS adatok kiértékelése

Az LC-MS/MS spektrumok alapján a fehérjék azonosítása a Thermo Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Fisher Scientific) szoftver segítségével történt, a UniProt adatbázisból 2013. augusztusában letöltött humán fehérjék szekvenciák használatával (88323 entry). A keresés során a megengedett kihagyott tripszin hasító helyek száma kettő volt. A ciszteinek jódcetamid módosítását és a metioninok oxidációját a szoftver variábilis módosításként vette figyelembe. A fehérjék találatként történő elfogadása 99%-os XCorr score érték felett történt. Az azonosított fehérjék és peptidek a Scaffold v 4.0.5 (Proteome Software Inc.) szoftverrel is elemzésre kerültek. Csak azok a fehérjék kerültek elfogadásra, amelyek azonosítása minimum két peptid alapján történt peptid szinten 0,1%-os, míg fehérje szinten 1%-os „Fals discovery rate” (FDR) értékkel.

Az LC-MS^E adatok elemzése a ProteinLynx GlobalServer (Waters) szoftver 2.4 verziójával történt. A fehérjék azonosítása az IdentityE algoritmus segítségével történt a UniProt adatbázisból letöltött humán szekvencia adatbázis alapján, amely a *Rhodobacter capsulatus* T33V citokróm c fehérje szekvenciáját is tartalmazta. A peptidek azonosításhoz a kritérium három egyező fragmens ion megléte, míg a fehérje azonosításhoz minimum egy peptid találat volt.

3.9 Mintaelőkészítés SRM analízishez

A tripszines emésztés előtt a fehérjéket 6 M urea (Bio-Rad) segítségével denaturáltuk, majd 10 mM ditiotreitollal redukáltuk. A redukált mintákat 20 mM jódcetamid segítségével alkiláltuk, majd 20 mM ammónium-bikarbonát puffert használva a mintákban lévő urea koncentrációját 1 M-ra csökkentettük. A tripszines emésztést MS tisztaságú TPCK kezelt szarvasmarha tripszinnel (ABSciex) 1:25 enzim:fehérje arányban végeztük 37°C-on egy éjszakán át. Az emésztett mintákat liofilizáltuk, majd 1% hangyasav oldatban feloldottuk. A mintákat C18 ZipTip (Millipore) hegyek használatával sómentesítettük, liofilizáltuk, majd 1% hangyasavban oldottuk fel.

3.10 SRM alapú célzott tömegspektrometriás módszer fejlesztése

A β -defenzin 1-4, lipokalin-1, laktoferrin, lizozim-c, lipofilin A, lakritin, Zn α 2 glikoprotein, Ig λ lánc, prolaktin indukált fehérje, dermcidin és galektin 3 kötő fehérje aminosav

szekvenciáit a UniProt adatbázisból letöltöttük, és a PeptideCutter szoftver segítségével *in silico* tripszines hasítást végeztünk. A 100% hasítási valószínűséggel keletkező triptikus peptid szekvenciákkal BLASTp analízist végeztünk az NCBI nem redundáns fehérje szekvencia adatbázisban, és azonosítottuk az egyedi, fehérje-specifikus peptideket. Az SRM átmenetek tervezését a Skyline szoftver segítségével végeztük el. A tisztítatlan SIL peptidek a JPT Peptide Technologies GmbH-től (Németország), míg a tisztított hBD2 peptid a PepscanPresto (Hollandia) cégtől kerültek beszerzésre. Minden egyszeresen töltött „y” ion SRM spektrumát regisztráltuk 4000 QTRAP (ABSciex) tömegspektrométerrel, és a legintenzívebb jelet adó átmenetekkel dolgoztunk. Az ütközési energia (CE) és a deklaszter potenciál (DP) optimalizálását a SIL peptidek használatával és a Skyline szoftverrel végeztük el. A legjobb átmenetek, az optimalizált CE és DP értékek meghatározása után SRM módszerfájlt készítettünk, melyet egészséges önkéntesektől gyűjtött könny és verejték mintákon teszteltünk, valamint a hBD-kre megállapított SRM átmeneteket sejtkultúrából származó mintákon teszteltük.

3.11 SRM analízis

A sejtkultúrából származó minták és a könnyminták esetében blokkolást alkalmaztunk. A sejt felülészók esetében egy véletlenszerűen kiválasztott kontroll mintát párosítottunk egy véletlenszerűen kiválasztott IL-1 β kezelt mintával, és ezeket a mintapárokat ugyanazon körülmények között egyszerre emésztettünk és analizáltunk. A sejtlyázatok esetében ugyanezt a módszert alkalmaztuk. A könnyminták esetében egy véletlenszerűen kiválasztott Alzheimer kóros betegől származó könnymintát párosítottunk egy véletlenszerűen választott kontroll mintával, majd a mintapárokat ugyanazon körülmények között egymás után analizáltuk. A SIL peptideket közvetlenül az analízis elvégzése előtt adtuk a mintákhoz. Minden analízis három párhuzamossal történt.

A kromatográfiás elválasztás az EasynLC II HPLC készüléken (Bruker) történt. A minták Zorbax 300SB-C18 oszlopon (5 \times 0,3 mm, 5 μ m pórusméret; Agilent) sómentesítettük, melyet egy 300SB-C18 analitikai oszlopon (150 mm \times 75 μ m, 3,5 μ m pórusméret; Agilent) történő elválasztás követett. Az A oldat 0,1% hangyasav tartalmú LC víz, a B oldat 0,1% hangyasav tartalmú LC acetonitril volt. Az alkalmazott áramlási sebesség 300 nl/perc volt a 30 perces elúciós idő alatt, melynek során 15 perc alatt emeltük a B oldat arányát 0%-ról 100%-ra.

Az SRM analíziseket a 4000 QTRAP (ABSciex) tömegspektrométeren végeztük a megtervezett és optimalizált SRM átmeneteket használva. A készüléket NanoSpray II MicroIon ionforrással használtuk és az Analyst szoftver (ABSciex) 1.4.2 verziójával működtettük. Az ionforrásra kapcsolt feszültség 2800 V volt, az ion source gas értéke 50 psi, a curtain gas értéke 20 psi, a forrás hőmérséklete pedig 70°C volt. A ciklusidő a hBD-k vizsgálata esetén 1,15 másodperc, a könnyfehérjék vizsgálatánál 2,5 másodperc, míg a verejték vizsgálatánál 1,5 másodperc volt. Az alkalmazott beállításokkal a hBD-k esetében kromatográfias csúcsonként közel 30 adatpontot, a könnyfehérjék esetében körülbelül 16 adatpontot, míg a verejték vizsgálatánál közel 20 adatpontot regisztráltunk.

Az SRM adatok kiértékelését a Skyline szoftverrel végeztük, melynek segítségével meghatároztuk az AUC értékeket, valamint az endogén:SIL peptidek arányát. A lineáris dinamikus tartományok megállapításához a logAUC értékeket ábrázoltuk a koncentráció logaritmusának függvényében és a görbék illesztéséhez logisztikus regressziót alkalmaztunk. A kvantitálási határ (LOQ) megállapítása ezen görbék alapján történt.

3.12 Statisztikai elemzés

A statisztikai analízist a Sigmaplot 12.0 szoftverrel végeztük el Student t-tesztet alkalmazva. A szignifikancia határ $p \leq 0,05$ volt.

Az Alzheimer kóros betegektől és illesztett kontrolloktól származó könnyminták analíziséből nyert AUC adatokat MSstats R-program-kompatibilis formába transzformáltuk egy általunk fejlesztett szoftver használatával. A SIL peptidekkel történő normalizálás és log₂ transzformálás után a csoportok közti különbséget varianciaanalízissel vizsgáltuk. A csoportbesorolást fix hatásként a mintákban lévő fehérjék mennyiségét pedig véletlen hatásként modelleztük. A nyers p-értékeken Benjamini Hochberg-féle FRD (false discovery rate) korrekciót végeztünk. Ezen kívül meghatároztuk a log₂ fold change értékeket, a Student T értékeket és a standard hiba értékeket. Az említetteken kívül ROC (Receiver-operating characteristic) analíziseket is végeztünk 95%-os konfidencia intervallumokkal.

4. Eredmények

4.1 β -defenzinek vizsgálata sejt kultúrákban és könnymintákban

A klasszikus antitest alapú kvantitálási módszereket széles körben használják fehérjék és peptidek kvantitatív és szemi-kvantitatív vizsgálatára, de a viszonylag szűk dinamikus tartomány, a megfelelő antitest hiánya és a több fehérje vagy peptid egyidejű vizsgálata korlátozhatja e módszerek széleskörű alkalmazhatóságát a testfolyadék proteomikában. Az SRM alapú módszerek multiplex jellegűek, több analit egyidejű vizsgálatát teszik lehetővé ugyanabban a mintában, így költséghatékonyabbak az antitest alapú technikáknál. Azért, hogy létrehozzunk egy költséghatékony és flexibilis multiplex módszert a leggyakoribb hBD-k vizsgálatára, emellett jobban megértsük a hBD-k expressziós profiljának változását gyulladásos stimulus hatására, SRM-alapú relatív kvantitálási módszert fejlesztettünk a hBD1-4 fehérjék mennyiségének meghatározására különféle biológiai mintákban.

A UniProt adatbázisból letöltött hBD1-4 fehérjék aminosav szekvenciáin *in silico* tripszines emésztést végeztünk a PeptideCutter szoftver használatával. A 100% valószínűséggel kihaladó peptid szekvenciákat BLASTp keresésnek vetettük alá, hogy azonosítsuk a specifikus peptideket. A BLASTp keresés eredményeként mind a négy vizsgált defenzinben sikerült specifikus peptideket találni, a hBD1 fehérjére az IQGTCYR szekvencia, a hBD2 fehérjére a GIGDPVTCLK szekvencia, míg a hBD3 fehérjére a GIINTLQK szekvencia bizonyult specifikusnak. A hBD4 esetében négy lehetséges specifikus peptidet azonosítottunk, ebből a négy peptidből a CONSeQuence predikciós algoritmus alapján az ICGYGTAR szekvencia bizonyult használhatónak SRM módszerfejlesztéshez. Az SRM átmeneteket a Skyline szoftver segítségével terveztük meg, majd a 4000 QTRAP tömegspektrométeren ellenőriztük őket. A DP és CE értékek optimalizálását a SIL peptidekkel végeztük el a Skyline szoftver segítségével.

4.1.1 A hBD peptidek lineáris dinamikus tartománya

A lineáris dinamikus tartomány meghatározásához sejt felülúszóhoz, illetve könnymintákhoz hozzáadott különböző hígítású (1000x-5x) SIL peptidek mennyiségét tanulmányoztuk. A megtervezett SRM módszer használatával ezerszeres hígítás (körülbelül 75 fmol), mind a négy defenzin esetében kimutatható volt. A kvantitálási határ (LOQ) és a lineáris dinamikus tartomány peptidenként és mátrixonként eltérő volt. A kvantitálási határ átlagosan a

250-szeres hígítás volt sejt felülúszó mintákban, míg könnymintában átlagosan az 500-szoros hígítás. A megtervezett SRM módszer tág dinamikus tartománnyal bír, ezáltal nagymértékű változások monitorozására is alkalmas, mely a biológiai rendszerek egy fő jellemzője.

4.1.2 β -defenzinek mennyiségi meghatározása sejtlizátum és sejt felülúszó mintákban

Bár a β -defenzinek a sejtekben termelődnek, hatásukat mégis a sejten kívül fejtik ki, ezért megvizsgáltuk a hBD1-4 fehérjék mennyiségét sejtlizátum és sejt felülúszó mintákban egyaránt. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a hBD fehérjék indukálhatóságát gyulladásozó jel hatására, a sejtvonalakat IL-1 β citokinnel stimuláltuk. A hBD1 fehérje szintje nem mutatott szignifikáns változást IL-1 β kezelés hatására a HT-29 és SW-1116 sejtekben, azonban a Caco2 sejtekben a hBD1 mennyiségi szignifikánsan lecsökkent a kezelés hatására. A szekretált hBD1 mennyiség HT-29 sejtekben szignifikánsan lecsökkent, míg a többi sejtkultúrában változatlan maradt. A hBD 3 fehérje mennyisége mindhárom sejtvonal esetében szignifikáns növekedést mutatott a kezelés hatására, mind az intracelluláris, mind pedig az extracelluláris térben. Az IL-1 β kezelés a hBD4 fehérje mennyiségében nem okozott szignifikáns változást, azonban a hBD1 fehérje változásához hasonló tendencia volt megfigyelhető. A szekretált hBD4 mennyisége szignifikánsan lecsökkent a HT-29 sejtkultúrából származó mintákban, míg az SW-1116 és Caco2 sejtekben a hBD1-hez hasonló változás volt megfigyelhető. Kísérleteink során a hBD2 fehérje mennyiségét csak Caco2 sejtekben tudtuk meghatározni, HT-29 és SW-1116 sejtkultúrában a mennyisége a módszer kimutatási határa alá esett. Caco2 sejtekben IL-1 β kezelés hatására a hBD2 mennyisége szignifikánsan megemelkedett mind az intracelluláris, mind pedig az extracelluláris térben. Eredményeink alapján az SRM módszer alkalmas a β -defenzinek mennyiségi vizsgálatára komplex biológiai mintákban, emellett kísérleteink alátámasztották a hBD2 és hBD3 fehérjék indukálhatóságát gyulladásozó jel hatására.

4.2 Alzheimer kórban szenvedő betegek könnyfehérjéinek vizsgálata

Több kutatócsoport is bizonyította, hogy az Alzheimer kór patomechanizmusában a szem is érintett. Többféle látási problémát írtak le Alzheimer kóros betegekben, valamint amiloid plakkok jelenlétét igazolták Alzheimer kóros betegek szemlencséjében és retinájában. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy a kifejlesztett SRM módszer alkalmazható-e testfolyadékok analízisére, megvizsgáltuk a hBD fehérjék mennyiségét egészséges önkéntesektől

és Alzheimer kóros betegektől származó könnymintákban. Az Alzheimer kóros betegek esetében a hBD-k mennyisége a kimutatási határ alá esett, azonban az egészséges önkéntesek könnymintáiban képesek voltunk a hBD-k kimutatására és relatív kvantitálására. A könnyminták legkisebb mennyiségben hBD2-t tartalmaztak, míg legnagyobb mennyiségben a hBD3 fehérje volt jelen. A hBD1 és hBD4 fehérjék mennyiség közel azonos volt a könnymintákban. A könnymintákban meghatározott hBD-k mennyisége alacsonyabb volt a sejtkultúrákból származó mintákhoz képest, mely a defenzinek szövettípustól függő, eltérő mértékű expressziójára utal. Következő lépésként könnymintákban megvizsgáltuk a hBD2 fehérje mennyiségét ELISA kísérletek segítségével, majd az eredményeket összehasonlítva a kifejlesztett SRM módszerrel nyert adatokkal, a két módszerrel nyert eredmények korreláltak egymással, további bizonyítékként szolgálva az SRM módszer alkalmazhatóságára kis mennyiségű testfolyadék minták esetében.

Mivel a hBD1-4 fehérjéket nem tudtuk kimutatni az Alzheimer kóros betegek és illesztett kontrollok könnymintáiban, a könnyfehérjéket átfogóbb analízisnek vetettük alá.

4.2.1 A könny fehérje összetételének változása Alzheimer kórban

Az összegyűjtött könnymintákat megvizsgálva kimutattuk, hogy az Alzheimer kóros betegek könnyében a fehérje koncentráció szignifikánsan magasabb ($8,8 \pm 2,9 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) a kontroll csoporthoz képest ($4,4 \pm 1,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). A könny szekréciónál is szignifikáns növekedést tapasztaltunk az Alzheimer kóros betegek esetében ($12 \pm 2 \mu\text{l}/\text{min}$) a kontroll csoporthoz képest ($6 \pm 2 \mu\text{l}/\text{min}$).

Azért, hogy megvizsgáljuk a könny fehérje összetételét SDS poliakrilamid gél elektroforézist végeztünk három Alzheimer kóros és két kontroll könnymintán. A gél festése után 13 sávot azonosítottunk. A sávok denzitometriás kiértékelése során az Alzheimer kóros betegektől származó mintákban szignifikáns intenzitáscsökkenését tapasztaltuk 11 sáv esetében. A sávokat kivágtuk, majd tripszines emésztést követően a fehérjéket LC-MS/MS módszerrel azonosítottuk.

LC-MS/MS analízissel 17 fehérjét sikerült azonosítani, melyek mindegyike ismert könnymirigy eredetű fehérje. Megvizsgálva a lecsökkent mennyiségű fehérjék funkcióját kiderült, hogy mindegyikük a kémiai barrier része, ezáltal szerepet játszik szervezetünk védelmében. Adataink arra utalnak, hogy az Alzheimer kór feltehetően megváltoztatja a kémiai

barrier összetételét, ami összhangban van az irodalmi adatokkal. Korábbi kutatások igazolták, hogy különböző stimulusok hatására és patológiás körülmények között módosul a kémiai barrier összetétele.

4.2.2 SRM módszertervezés könnyfehérjék vizsgálatára

A könny fehérje profiljának behatóbb vizsgálatára SRM alapú célzott tömegspektrometriás módszert fejlesztettünk ki. A csökkent mennyiségű fő könnyfehérjék közül a lipokalin-1, laktoferrin, lizozim-c, lipofilin A, lakritin, Zn α 2 glikoprotein, Ig λ lánc és prolaktin indukált fehérjét választottuk ki további vizsgálatokra, valamint irodalmi adatok és saját előzetes eredményeink alapján a dermcidint és a galektin 3-kötő fehérjét is bevontuk a vizsgálatokba. Az SRM módszer tervezését a Skyline szoftver segítségével végeztük el, majd SIL peptidek segítségével a módszert optimalizáltuk.

A SIL peptidekből hígítási sort készítettünk (10000x-5x) majd könnymintákban ellenőriztük a módszerünk érzékenységét és dinamikus tartományát. A legtöbb peptid tízezerszeres hígításnál (körülbelül 7,5 fmol) is kimutatható volt és az AUC értékek széles koncentráció-tartományban korreláltak a bejuttatott anyagmennyiséggel tág dinamikus tartományt eredményezve. A kifejlesztett SRM módszer megfelelőnek bizonyult könnyfehérjék széles koncentráció-tartományban történő vizsgálatára.

4.2.3 A szem kémiai barrierjének változása Alzheimer kórban

A kémiai barriert alkotó fehérjék mennyiségi vizsgálatát az optimalizált SRM módszer segítségével végeztük el 37 könnymintán, melyek 14 Alzheimer kóros betegtől és 9 kontrolltól származtak. Hasonlóan az elektroforézis során nyert adatokhoz, szignifikáns csökkentést tapasztaltunk a lipokalin-1, a laktoferrin, a lakritin, a lizozim-c és a prolaktin indukált fehérje szintjében az Alzheimer kóros betegektől származó mintákban, emellett a dermcidin mennyisége szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest. A csökkent mennyiségű fehérjék mindegyike a könnymirigyben termelődik, mely arra enged következtetni, hogy az Alzheimer kór összefüggésben állhat a könnymirigyek csökkent működésével.

4.2.4 Alzheimer kórra specifikus potenciális biomarkerek azonosítása

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy a szignifikáns különbséget mutató fehérjék használhatóak-e Alzheimer kórra specifikus könny biomarkerként ROC analízist végeztünk. A legjobb érzékenységet (91%) a lizozim-c és a lakritin fehérjék kombinációjával értük el, azonban a legkiegyensúlyozottabb értékeket a lipokalin-1, a dermcidin, a lizozim-c és a lakritin fehérjék kombinációja adta. Ebben az esetben az AUC érték 0,80, az érzékenység 81%, a specificitás pedig 77% volt, amely egy jól használható biomarker kombinációra utalt.

4.3 A verejték fehérjetartalmának vizsgálata

A bőr egy hatékony fizikai barriert képez, valamint a verejték szekréciójával kémiai barriert is biztosít a potenciális patogénekkal szemben. A verejték folyamatosan termelődő, könnyen gyűjthető testfolyadék, ezáltal biomarker kutatásokban könnyen felhasználható. Bár a verejték proteom változását biomarkerek azonosítása céljából több tanulmányban is vizsgálták, a normál verejték proteomot részletesen még nem tanulmányozták. Annak érdekében, hogy betegség-specifikus biomarkereket azonosíthassunk a verejtékben, első lépésként a fiziológias körülmények között képződő verejték fehérje összetételét és szerepét szükséges megvizsgálni.

4.3.1 A verejték fehérjéinek azonosítása és kvantitálása

Egészséges önkéntesektől gyűjtött verejték pool vizsgálatát jelölés nélküli kvantitálási technikával végeztük el. A nagy felbontású LC-MS/MS analízisek adatai alapján 95 fehérjét azonosítottunk. Ezen fehérjékből húszat eddig még nem azonosítottak más munkacsoportok a verejték alkotójaként. A verejtékfehérjék mennyiségi meghatározását a 850 fmol *Rhodobacter capsulatus* citokróm c belső standard fehérjével normalizálva végeztük el. A legnagyobb mennyiségben jelenlévő fehérje a dermcidin volt 1,14 pmol/μg koncentrációban. A dermcidin mellett a klaszterin és az apolipoprotein D fehérjék is jelentős mennyiségben voltak jelen a verejtékben. A dermcidin, a kalszterin, az apolipoprotein D és a prolaktin indukált fehérje 46%, 17%, 15%, illetve 8%-át adta a szekretált verejték teljes fehérje mennyiségének, míg a szérumban albumin csupán a szekretált verejték proteom 6%-a volt. Adataink alapján a dermcidin, kalszterin, apolipoprotein D, prolaktin indukált fehérje és a szérumban albumin fehérjék adják a teljes szekretált verejték proteom 91%-át. Tudomásunk szerint elsőként sikerült a normál körülmények között szekretálódó verejték összetételét megvizsgálnunk.

4.3.2 Dermcidin és prolaktin indukált fehérje SRM alapú relatív kvantitálása

A jelölés nélküli kvantitálási eredmények validálása céljából SRM alapú célzott tömegspektrometriás módszert fejlesztettünk ki a dermcidin és a prolaktin indukált fehérje relatív mennyiségi meghatározására. *In silico* tripszines emésztés és BLASTp analízisek után az ENAGEDPGLAR peptidet a dermcidinre jellemző triptikus peptidként, míg a YTACLCDNPK és TVQIAAVVDVIR peptideket a prolaktin indukált fehérjére jellemző triptikus peptidekként azonosítottuk. Skyline szoftver segítségével a peptidekre SRM módszert fejlesztettünk, majd SIL peptidek segítségével a módszert optimalizáltuk. Az egészséges önkéntesektől származó verejték pool SRM alapú vizsgálatával meghatároztuk a dermcidin és a prolaktin indukált fehérje relatív mennyiségét. Mind az SRM alapú, mind a jelölés nélküli kvantitálás igazolta, hogy a dermcidin a fő verejtékalkotó fehérje.

4.3.3 Az abundáns verejtékfehérjék funkciói

Ahhoz, hogy jobban megértsük a verejtékfehérjék szerepét, GeneOntology (GO) analízis segítségével meghatároztuk az azonosított fehérjék funkcióit. A GO annotációk alapján sok verejtékfehérjének van szerepe az immunrendszer működésében, és a kórokozókkal szembeni védelmet biztosító fehérjék száma is igen magasnak bizonyult. A fő verejtékfehérjékről elérhető információk alapján elmondhatjuk, hogy mindegyiküknek szerepe van a kórokozókkal szembeni védelemben, ezáltal a kémiai barrier részét képezik, így mennyiségi változásuk összefüggésben állhat a fertőzések kialakulásával.

5. Diskusszió

A testfolyadékok folyamatosan elérhető, könnyen gyűjthető forrásai a potenciális biomarkereknek. Több tanulmány is igazolta, hogy különféle testfolyadékok fehérjetartalmának változása összefüggésben van a lokális és szisztémás patológiás állapotokkal. Mivel a testfolyadékok relatíve nagy mennyiségben tartalmaznak AMP-eket, és ismeretes, hogy az AMP koktél összetétele változik különféle stimulusok hatására, így az AMP-k a biomarker kutatások potenciális célpontjai. Munkám fókuszában a tömegspektrometriás módszerfejlesztés és különféle AMP-k mennyiségi változásainak vizsgálata állt sejtkultúrákban, könnyben és verejtékben.

A módszerfejlesztés során az egyes paraméterek optimalizálása sokszor nagy mennyiségű mintát igényel. Ahhoz, hogy elegendő biológiai mintánk álljon rendelkezésre a módszerfejlesztés során, első lépésként a módszer fejlesztését és optimalizálását sejtkultúrából származó mintákon végeztük el, melyet második lépésként a testfolyadékok vizsgálata követett.

A bél eredetű epitél sejtek jól ismert modellként szolgálnak a gyulladós bélbetegségek tanulmányozására. Az epitél sejtek által szekretált hBD-k a bélrendszer kémiai barrierének esszenciális elemei, valamint fontos szerepük van a gyulladós bélbetegségek patomechanizmusában is. Így ezek a sejtek kiváló alanyok a hBD-k tanulmányozására. A UniProt adatbázisban jelenleg hat β -defenzin található, azonban amikor a kísérleteinket végeztük, a β -defenzin 5 és 6 fehérjéről nem állt rendelkezésre megfelelő minőségű adat. Célunk egy olyan célzott tömegspektrometriás módszer kifejlesztése és optimalizálása volt, mely alkalmas a β -defenzin 1-4 fehérjék intracelluláris és szekretált formájának kimutatására és relatív kvantitálására. Mind a négy vizsgált defenzin esetén sikerrel azonosítottunk egyedi szekvenciákat, melyek vizsgálatára SRM átmeneteket terveztünk. SIL peptidek segítségével megvizsgáltuk a módszer érzékenységét és lineáris dinamikus tartományát. Az adatok alapján a módszer elég érzékenynek és specifikusnak bizonyult a vizsgált defenzinre. A klasszikus antitest alapú módszerekkel összevetve (ELISA, Western-blot) a kifejlesztett SRM módszer kevésbé érzékeny, mivel az antitest alapú módszerekkel ellentétben nem tartalmaz jelerősítő rendszert, viszont a lineáris tartomány tágabbnak bizonyult a vizsgált mátrixokban. Az SRM módszer lehetővé teszi egyszerre több analit költséghatékony elemzését ugyanazon mintából, ami

különösen fontos a biológiai és orvosi kutatásokban, ahol a vizsgálandó minták mennyisége limitált.

A kifejlesztett SRM módszer segítségével megvizsgáltuk a hBD 1-4 fehérjék mennyiségét IL-1 β kezelt és kontroll HT-29, SW-1116 és CaCo2 sejtek lizátumában és felülúszójában. Mindhárom vizsgált sejtvonalban sikerült kimutatunk és kvantitálnunk a hBD1, hBD3 és hBD4 fehérjéket, míg a hBD2-t csak CaCo2 sejtekben sikerült azonosítani és kvantitálni. A hBD család tagjai lehetnek konstitutív módon termelődőek, vagy patogén stimulus hatására indukálódhatnak. Korábban bizonyított, hogy a gyulladáscitokinek, mint az IL-1 β megemelik a hBD2 és a hBD3 fehérjék expressziójának mértékét, ezért ezek az indukálható hBD-k családjába tartoznak. Az irodalomban fellelhető adatok alapján a hBD1 konstitutív módon termelődik és gyulladás hatására nem indukálódik. Az eredményeink szerint az intracelluláris és szekretált hBD1 mennyisége nem emelkedett meg IL-1 β kezelés hatására, ami megerősíti a hBD1 nem indukálható jellegét. Emellett megerősítettük a hBD2 és a hBD3 fehérje indukálhatóságát; a vizsgált sejtvonalokban megemelkedett a szintjük gyulladási szignál hatására. A hBD1-3 fehérjékkel ellentétben, a hBD4 fehérje kevésbé jól karakterizált, az indukálhatóságáról és szerepéről kevés adat áll rendelkezésre. Irodalmi adatok alapján a hBD4 indukálható, viszont nem a klasszikus gyulladáscitokinek hatására. Az irodalmi adatokkal egyezve az eredményeink alapján a hBD4 mennyisége nem emelkedett meg IL-1 β kezelés hatására, és a mennyiségi változása a hBD1 tendenciáját követte. Garcia és munkatársai leírták, hogy a hBD4 együttműködik a hBD3-mal, ami megnövekedett antimikrobiális aktivitáshoz vezet, azonban az adatok alapján ehhez nem szükséges a hBD4 expressziójának növelése. Az adataink arra engednek következtetni, hogy a hBD1 és a hBD4 fehérjék hasonló expressziós profillal rendelkeznek, azonban nem találtunk irodalmi adatokat ezen fehérjék közti kapcsolatról.

Eredményeink jól mutatják a kifejlesztett SRM módszer használhatóságát a hBD1-4 fehérjék mennyiségi vizsgálatára sejtkultúrában, valamint további bizonyítékként szolgálnak a hBD2 és hBD3 fehérjék indukálhatóságára.

A könnyű a biomarker kutatások egy kiváló jelöltje, mivel egyszerűen és nem invazív módon gyűjthető, valamint információt szolgáltat a szem patológiás állapotairól, mint a száraz szem szindróma, diabéteszes retinopátia, stb., illetve szisztémás patológiás állapotokról. Egészséges önkéntesektől gyűjtött könnymintákban a kifejlesztett SRM módszer segítségével megvizsgáltuk a hBD1-4 fehérjék szintjét, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a módszer

valóban használható kis mennyiségű testfolyadék minták elemzésére is. Az SRM módszer segítségével mind a 4 hBD fehérjét sikeresen kimutattuk és kvantitáltuk könnymintákban. A hBD2 mennyisége volt a legalacsonyabb, míg a hBD3 volt jelen legnagyobb mennyiségben. A hBD1 és a hBD4 fehérjék szinte azonos mennyiségben voltak jelen. A hBD1-4 fehérjék mennyisége könnymintákban alacsonyabbnak mutatkozott a sejt kultúrából nyert értékeknél, ami arra enged következtetni, hogy a defenzinek eltérő szöveti eloszlást mutatnak. Az SRM mérések során meghatározott hBD2 fehérje mennyiségét ELISA kísérletekkel validáltuk, és a két módszer eredményei jól összevethetőnek bizonyultak. Az adataink bizonyítják, hogy a kifejlesztett SRM módszer alkalmas a hBD1-4 testfolyadékokból történő meghatározására, ami orvostudományi szempontból releváns. Az SRM módszer az antitest alapú kvantitálási módszerek alternatívájaként szolgálhat, és különösen hasznos lehet azokban az esetekben, ahol több mint egy hBD fehérjének a mennyiségét szükséges meghatározni limitált mennyiségű mintákból.

A már bizonyítottan jól működő módszerrel a kezünkben célunk a továbbiakban az antimikrobiális és immunmodulátor fehérjék mennyiségének vizsgálata volt betegektől származó mintákban. Vizsgálatainkhoz az Alzheimer kórt választottuk, ami a leggyakoribb időskori demencia és világszerte több millió embert érint.

Az Alzheimer kór etiológiája nem teljesen tisztázott. A meglévő adatok alapján a β -amiloid peptidek abnormális termelése és akkumulációja, a mikrotubulusokhoz kapcsolódó tau fehérje hiperfoszforilációja és az α -szinukleinek fontos szerepet játszanak az Alzheimer kór patomechanizmusában. Az Alzheimer kór patológiai jelei a szenilis plakkok és a neurofibrilláris rostok megjelenése az agyban, de irodalmi adatok szerint a betegség a látórendszert is érinti. Alzheimer kórral összefüggő változásokat írtak le a szemben, a látópályában és a látóközpontban is. Amiloid plakkokat azonosítottak Alzheimer kóros betegek retinájában és szemlencséjében, valamint állatkísérletek bizonyították a retinában és az agyban lerakódott amiloid plakkok közti korrelációt. Alzheimer kóros betegekben kimutatták a retina morfológiájának megváltozását, valamint a retina érhálózatában történő változásokat; ami megmagyarázza csökkent vizuális teljesítményüket. A felállított hipotézisünk az volt, hogy a retina morfológiájában és vérellátásában történő változások megváltoztathatják a szem mikrokozonyát, ami hatással van a szekretált könnyfehérjékre is; így célul tűztük ki Alzheimer kóros betegek könnyfehérjéinek vizsgálatát proteomikai módszerekkel.

A hBD1-4 fehérjék szintjét megvizsgáltuk Alzheimer kóros betegektől és kontrolloktól származó könnymintákban, de a betegektől származó mintákban a mennyiségük a detektálási határ alá esett. Azért, hogy jobban megértsük a szemben történő változásokat, a könnyfehérjéket részletesebb vizsgálatoknak vetettük alá.

Az Alzheimer kóros betegek könnysekreációs rátája és a könnyük fehérje koncentrációja szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest. Emellett az általunk vizsgált tíz fehérje mennyisége szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott a betegek könnymintáiban, ami az irodalmi adatokkal összhangban, kiterjedt szemszövődményekre enged következtetni. Az öt minta elektroforetikus analízisével kimutatott szignifikáns csökkenést SRM alapú célzott proteomikai módszerrel validáltuk 37 könnymintán. Az SRM analízisek alapján a lipokalin-1, laktoferrin, lakritin, lizozim-c és prolaktin indukált fehérje szignifikánsan alacsonyabb mennyiségben volt jelen az Alzheimer kóros betegek könnyében a kontroll csoporthoz képest. A vizsgált fehérjék közül a dermcidin volt az egyetlen, melynek szintje szignifikánsan megemelkedett az Alzheimer kóros mintákban. A dermcidin a verejték fő fehérjéje, melyet az epitel sejtek termelnek és széles spektrumú antimikrobiális aktivitással rendelkezik. A csökkent expressziójú fehérjéket a könnymirigyek szekretálják és a szem elsődleges védelmi vonalának kialakításában van szerepük. A kémiai barrier megváltozásával megnövekedhet a szemfertőzések valószínűsége, azonban nem találtunk irodalmi adatokat arra vonatkozóan, hogy Alzheimer kóros betegeknél gyakoribbak lennének a szemfertőzések. Azonban csökkent corneális érzékenységet és abnormális könnyfunkciókat már írtak le Alzheimer kóros és más neurodegeneratív betegségben szenvedő paciensek esetében. Míg a könnymirigyek által termelt fő AMP-k szintje lecsökken, a dermcidin a széleskörű antimikrobiális aktivitásának köszönhetően gátolhatja a baktériumok elszaporodását, ezáltal megelőzheti a fertőzéseket. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy a szignifikáns különbséget mutató fehérjék közül melyek lehetnek Alzheimer kórra jellemző potenciális biomarkerek, ROC analíziseket végeztünk minden egyes fehérjével és ezek különféle kombinációival. A legjobb érzékenységet (91%) a lizozim-c és lakritin kombinációja adta, viszont a legkiegyensúlyozottabb értékeket a lipokalin-1, dermcidin, lizozim-c és lakritin kombinációval értük el. Ebben a kombinációban a ROC görbe AUC értéke 0,80, az érzékenység 81%, a specificitás pedig 77% volt, mely egy jól használható biomarker kombinációra enged következtetni.

A könnyen és nem invazív módon gyűjthető könny segítségével egy egyszerű tesztet lehetne kifejleszteni. Azokat a betegeket, akiknek megnövekedett a könny szekréciós rátája és a könny fehérje koncentrációja, valamint pozitívak a lakritin, lipokalin-1, dermcidin és lizozim-c biomarker kombinációra további képpalkotó, pszichiátriai és cerebrospinális folyadék vizsgálatoknak lenne szükséges alávetni. Figyelembe véve a vizsgálataink során használt kis mintaszámot, a jövőben nagyobb populáció vizsgálata is szükséges, hogy megbizonyosodjunk ezen potenciális biomarkerek használhatóságáról.

A könny és a bélrendszer mellett a bőr szintén kialakít egy effektív antimikrobiális védelmi rendszert, melyet a komplex fizikai és kémiai barrier biztosít, szorosan együttműködve az immunrendszer elemeivel és a normál baktérium flórával. Keveset tudunk a verejték fehérjéinek minőségi és mennyiségi változásának következményeiről, emellett pedig a verejték proteomja sem ismert részleteiben.

Vizsgálataink során egészséges önkéntesektől szaunázás során gyűjtött verejték mintákat analizáltunk. Korszerű proteomikai technikák segítségével 95 fehérjét azonosítottunk a vizsgált verejték poolban, melyek közül 20 fehérjét eddig még nem azonosítottak a verejtékben. A jelölés nélküli kvantitálás során nyert adatok felfedték, hogy a verejték proteomjának 91%-át hat nagy mennyiségben jelen lévő fehérje adja. A legnagyobb mennyiségben jelen lévő fehérje a dermcidin volt, mely a teljes fehérjetartalom 41%-át adja. A dermcidin mellett a klaszterin (17%), apolipoprotein D (15%), a prolaktin indukált fehérje (8%) és a szérum albumin (6%) volt jelen nagyobb mennyiségben a verejték poolban. Az eredmények validálása céljából SRM alapú célzott tömegspektrometriás módszerrel megvizsgáltuk a dermcidin és a prolaktin indukált fehérje mennyiségét a verejtékben. Az SRM analízisek megerősítették a jelölés nélküli kvantitálás eredményét, miszerint a verejtékben a dermcidin a legnagyobb mennyiségben jelen lévő fehérje.

Az azonosított verejték fehérjék GeneOntology vizsgálata feltárta, hogy sok fehérjének szerepe van az immunfolyamatokban és a mikroorganizmusok elleni védekezésben. Az irodalomban fellelhető adatokból kiderült, hogy a nagy mennyiségben jelen lévő dermcidin, klaszterin, apolipoprotein D, prolaktin indukált fehérje és szérum albumin mindegyike részt vesz a kémiai barrier felépítésében.

Összevetve az adatainkat és az irodalomban fellelhető információkat egyértelművé válik, hogy a nagy mennyiségben jelen lévő verejtékfehérjék a kémiai barrier esszenciális

komponensei. A dermcidin és a prolaktin indukált fehérje valószínűleg fontos szerepet játszik az antimikrobiális védelemben, míg a kalszterin chaperonként és a mátrix metalloproteinázok inhibitoraként működik. Valószínűsíthető, hogy az apolipoprotein D funkciója a lipid peroxidáció megelőzése, míg az albumin szkevendzserként működve megakadályozza egyes molekulák felhalmozódását a bőr felületén, illetve antioxidáns hatással is rendelkezik az N-terminális tetrapeptidjének köszönhetően.

Az analitikai technikák fejlődésével lehetővé vált a kis mennyiségben gyűjthető, vagy alacsony fehérjekoncentrációjú testfolyadékok vizsgálata is, mint a humán verejték és a könny; ami lehetőséget ad új potenciális biomarkerek azonosítására könnyen elérhető és nem invazív módszerrel gyűjthető biológiai mintákból. Több tanulmány is bizonyította, hogy az AMP-k mennyiségének változása összefüggésben állhat lokális és szisztémás patológiás elváltozásokkal, így az AMP-k a biomarker kutatások megfelelő alanyai.

Munkánk során, a klasszikus antitest alapú kvantitálási módszerek alternatívjaként, sikeresen kifejlesztettünk és validáltunk egy SRM-alapú célzott proteomikai módszert a hBD1-4, lipokalin-1, laktoferrin, lakritin, lizozim-c, lipofilin A, Ig λ lánc, Zn α 2 glikoprotein, prolaktin indukált, dermcidin és galektin 3-kötő fehérje relatív kvantitálására komplex biológiai mintákban.

A könny és verejték a folyamatos elérhetőség miatt a biomarker kutatások megfelelő alanyai, azonban a szekréciós ráta miatt általában kis mennyiségben gyűjthetők. Figyelembe véve, hogy a normál verejték proteomot még nem vizsgálták részletesen, kvantitatív proteomikai módszerekkel analizáltuk a verejtékben található fehérjéket, hogy jobban megértsük a bőr kémiai barrierének mibenlétét. Eredményeink kiindulópontként szolgálhatnak későbbi biomarker kutatásokhoz és segítségre lehetnek a bőr vagy szisztémás betegségek diagnózisában.

Multiplex SRM alapú célzott proteomikai módszerrel bizonyítottuk a könny hasznát a biomarker kutatásokban és sikerrel azonosítottunk egy Alzheimer kórra specifikus potenciális biomarker panelt. Amint ezeket a potenciális biomarkereket validálják, a könny vizsgálata a mindennapi orvoslás részévé válhat, és a pozitív teszteredményű betegek továbbirányíthatók speciálisabb vizsgálatokra, ezáltal elősegítve a betegség diagnózisát. Ha a diagnózist hamar sikerül felállítani, az időben kezdett kezeléssel javíthatunk az Alzheimer kóros betegek életminőségén.

Eredményeink bizonyítják az SRM alapú célzott proteomikai módszerek használhatóságát a nem invazív módon gyűjthető testfolyadékokon végzett biomarker kutatásokban, valamint a biomarkerek validálásában.

6. Összefoglalás

A disszertáció a kémiai barrier részét képező antimikrobiális és immunmodulátor fehérjék mennyiségi változásainak vizsgálatára fókuszál epitel sejtkultúrában valamint könny és verejték mintákban célzott proteomikai módszer alkalmazásával. Vizsgálatainkhoz SRM alapú célzott tömegspektrometriás módszert fejlesztettünk β -defenzin 1-4, lipokalin-1, laktotranszferrin, extracelluláris glikoprotein lakritin, lizozim-C, lipofilin A, Ig λ -lánc C régió, prolaktin indukált fehérje, Zn- α -2-glikoprotein, galektin 3 kötő fehérje és dermcidin fehérjék szemi kvantitatív meghatározására komplex biológiai mintákban.

Sejtkultúrákon végzett kísérleteink során igazoltuk a β -defenzin 2 és 3 fehérjék expressziójának indukcióját gyulladósos jel hatására, emellett bizonyítottuk, hogy a β -defenzin 1 és 4 nem indukálódik klasszikus gyulladósos stimulusra. A β -defenzinek mennyiségét könnymintákban vizsgálva megállapítottuk, hogy az SRM módszer alkalmas β -defenzinek vizsgálatára kis mennyiségű biológiai mintákból is. Mivel bizonyított, hogy a kémiai barrier patológiás esetekben megváltozik, emellett bizonyították a könnyfehérjék mennyiségi változását neurodegeneratív betegségekben, megvizsgáltuk a β -defenzin 1-4 mennyiségét Alzheimer-kóros betegektől származó könnymintákban. A β -defenzinek mennyisége a kimutatási határ alá esett, így a könnymintákat további vizsgálatoknak vetettük alá. Szignifikáns növekedést tapasztaltunk az Alzheimer-kóros betegek könny szekréciós rátájában és a könny fehérje koncentrációjában, emellett megfigyeltük a fő könnyfehérjék mennyiségének csökkenését a kontroll csoporthoz képest. SRM kísérletekkel igazoltuk a fő könnyfehérjék mennyiségének csökkenését, valamint a dermcidin szint emelkedését. ROC analízisek segítségével kimutattuk, hogy a lipokalin-1, lizozim-C, dermcidin és lakritin fehérjék kombinációja biomarkerként használható lehet az Alzheimer-kór diagnózisában. A könny mellett a verejtékben lévő AMPk is a kémiai barrier részét képezik és mivel a verejték normál fehérjetartalmát részletesen nem tanulmányozták, tömegspektrometriás módszerek segítségével meghatároztuk a normál verejték proteomot. Vizsgálatainkban 95 fehérjét azonosítottunk ezekből 20 fehérjét eddig még nem azonosítottak a verejték alkotójaként. Az azonosított abundáns fehérjék a dermcidin, prolaktin indukált fehérje, kalszterin, apolipoprotein D és a szérum albumin a kémiai barrier fontos alkotórészei.

Eredményeink alátámasztják a célzott proteomika módszerek felhasználhatóságát és fontosságát a testfolyadékokból történő biomarker kutatások területén.

7. A Kenézy élettudományi könyvtár által kibocsátott publikációs jegyzék



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/220/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kalló Gergő
Neptun kód: RG1NN3
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10043520

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kalló, G.**, Emri, M., Varga, Z., Ujhelyi, B., Tózsér, J., Csutak, A., Csósz, É.: Changes in the chemical barrier composition of tears in Alzheimer's disease reveal potential tear diagnostic biomarkers.
PLoS One. 11 (6), e0158000, 2016.
IF: 3.057 (2015)
2. Csósz, É., Emri, G., **Kalló, G.**, Tsapralis, G., Tózsér, J.: Highly abundant defense proteins in human sweat as revealed by targeted proteomics and label-free quantification mass spectrometry.
J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 29 (10), 2024-2031, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jdv.13221>
IF: 3.029
3. **Kalló, G.**, Chatterjee, A., Tóth, M., Rajnavölgyi, É., Csutak, A., Tózsér, J., Csósz, É.: Relative quantification of human [béta]-defensins by a proteomics approach based on selected reaction monitoring.
Rapid Commun. Mass Spectrom. 29 (18), 1623-1631, 2015.
IF: 2.226





További közlemények

4. Csósz, É., Deák, E., **Kalló, G.**, Csutak, A., Tózsér, J.: Diabetic retinopathy: proteomic approaches to help the differential diagnosis and to understand the underlying molecular mechanisms.
J. Proteomics. S1874-3919 (16), 30280-30289, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.034>
IF: 3.867 (2015)
5. Hutóczki, G., Bognár, L., Tóth, J., Scholtz, B., Zahuczky, G., Hanzély, Z., Csósz, É., Reményi-Puskár, J., **Kalló, G.**, Hortobágyi, T., Klekner, Á.: Effect of Concomitant Radiochemotherapy on Invasion Potential of Glioblastoma.
Pathol. Oncol. Res. 22 (1), 155-160, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-015-9989-5>
IF: 1.94 (2015)
6. Virga, J., Bognár, L., Hortobágyi, T., Zahuczky, G., Csósz, É., **Kalló, G.**, Tóth, J., Hutóczki, G., Reményi-Puskár, J., Steiner, L., Klekner, Á.: Prognostic role of the expression of invasion-related molecules in glioblastoma.
J. Neurol. Surg. Part A. [Epub ahead of print], 2016.
IF: 0.723 (2015)
7. Klekner, Á., Hutóczki, G., Virga, J., Reményi-Puskár, J., Tóth, J., Scholtz, B., Csósz, É., **Kalló, G.**, Steiner, L., Hortobágyi, T., Bognár, L.: Expression pattern of invasion-related molecules in the peritumoral brain.
Clin. Neurol. Neurosurg. 139, 138-143, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clineuro.2015.09.017>
IF: 1.198
8. Alvarado, G., Jeney, V., Tóth, A., Csósz, É., **Kalló, G.**, Huynh, A. T., Hajnal, C., Kalász, J., Páztorné Tóth, E., Édes, I., Gram, M., Akerström, B., Smith, A., Eaton, J. W., Balla, G., Papp, Z., Balla, J.: Heme-induced contractile dysfunction in Human cardiomyocytes caused by oxidant damage to thick filament proteins.
Free Radic. Biol. Med. 89, 248-262, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.158>
IF: 5.784





DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



9. Palicz, Z., Jenes, Á., Gáll, T., Miszti-Blasius, K., Kollár, S., Kovács, I., Emri, M., Márián, T., Leiter, É., Pócsi, I., Csősz, É., **Kalló, G.**, Hegedűs, C., Virág, L., Csernoch, L., Szentesi, P.: In vivo application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 269 (1), 8-16, 2013.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.02.014>

IF: 3.63

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 25,454

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8,312

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, 2016.08.23.



Előadások:

Éva Csősz, Péter Lábiscsák, Gergő Kalló, Miklós Emri, Viktória Bácsik, Ildikó Tar, Mária Fera, József Tőzsér, Ildikó Márton: Proteomics examination of OSCC-specific salivary biomarkers in a Hungarian population using Luminex-based multiplex assay and SRM-based targeted proteomics method, FEBS3+ Meeting, Protorož, 2015. *

Gergő Kalló, Adrienne Csutak, Miklós Emri, Zsófia Varga, József Tőzsér, Éva Csősz: Analysis of several antimicrobial and immunomodulatory proteins in tears of patients with Alzheimer's disease, 8th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2015.

Éva Csősz, Adrienne Csutak, Gergő Kalló, Miklós Emri, Péter Lábiscsák, Ildikó Márton, Eszter Deák, Bernadett Jakob, Zsuzsanna Pató, Goran Petrovszki, József Tőzsér: Body fluid analysis with targeted proteomics, 8th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2015. *

Éva Csősz, Adrienne Csutak, Gergő Kalló, Miklós Emri, Péter Lábiscsák, Ildikó Márton, József Tőzsér: Selected reaction monitoring as a versatile tool for biomarker discovery, Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Debrecen, 2014. *

Éva Csősz, Gergő Kalló, Adrienne Csutak, József Tőzsér: Development of SRM-based targeted proteomics methods for study of tears antimicrobial and immunomodulatory peptides, 32nd Informal Meeting on Mass Spectrometry, Balatonszárszó, 2014. *

Gergő Kalló, Arunima Chatterjee, Éva Rajnavölgyi, József Tőzsér, Éva Csősz: Quantification of human alpha and beta defensins in colonic epithelial cells by targeted MRM-based proteomics, 7th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Galyatető, 2014.

Éva Csősz, Gergő Kalló, Eszter Deák, József Tőzsér: Go targeted - the power of targeted proteomics analyses in the study of antimicrobial and immunomodulatory peptides, 7th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Galyatető, 2014. *

Kalló Gergő, Arunima Chatterjee, Rajnavölgyi Éva, Tőzsér József, Csósz Éva: Defenzinek mennyiségi meghatározása célzott tömegspektrometriás módszer segítségével, A szív és érbetegségek interdiszciplináris kutatása a DE OEC-ben TÁMOP konferencia, Debrecen, 2013.

Gergő Kalló, Arunima Chatterjee, Éva Rajnavölgyi, Éva Csósz, József Tőzsér: Defensin level determination by targeted proteomic approach, 7th Central and Eastern European Proteomics Conference, Jena, 2013.

Éva Csósz, Adrienne Csutak, Gergő Kalló, József Tőzsér: Blood, sweat and tears – body fluid proteomics with emphasis to antimicrobial and immunomodulatory peptide type biomarkers, Hungarian Molecular Life Sciences 2013 conference, Siófok, 2013. *

Poszter prezentációk:

Gergő Kalló, Miklós Emri, Zsófia Varga, József Tőzsér, Adrienne Csutak, Éva Csósz: Alterations in the chemical barrier components in tears of patients with Alzheimer's disease, FEBS3+ Meeting, Protorož, 2015.

G. Kalló, T. Székely, J.A. Mótyán, Sz. Benkő, J. Tőzsér and É. Csósz: Relative quantification of the human NOD-like receptor family CARD domain containing 5 (NLRC5) protein by targeted mass spectrometry approach, 33rd Informal Meeting on Mass Spectrometry, Szczyrk, 2015.

Gergő Kalló, Arunima Chatterjee, Éva Rajnavölgyi, József Tőzsér, Éva Csósz: Relative quantification of human defensins in colonic epithelial cells using targeted mass spectrometry-based analysis, Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Debrecen, 2014.

Gergő E. Kovács, Bence Farkas, János A. Mótyán, Alíz Varga, Gergő Kalló, Éva Csósz, Szilvia Benkő, József Tőzsér: Studies on the human NOD-like receptor family CARD domain containing 5 (NLRC5) protein, Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Debrecen, 2014. *

Bence Farkas, János András Mótyán, Alíz Varga, Gergő Kalló, Éva Csősz, Szilvia Benkő, József Tőzsér: Studies on the NOD-like receptor family member human NLRC5 protein, Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Debrecen, 2014. *

G. Kalló, A. Csutak, Z. Varga, J. Tőzsér and É. Csősz: Determination of human β -defensins in tears of patients with Alzheimer's disease, 8th Central and Eastern European Proteomics Conference, Vienna, 2014.

G. Kalló, A Chatterjee, É. Rajnavölgyi, J. Tőzsér, É. Csősz: Relative quantification of human defensins in colonic epithelial cells using targeted mass spectrometry-based analysis, 32nd Informal Meeting on Mass Spectrometry, Balatonszárszó, 2014.

Pató Zsuzsanna, Kalló Gergő, Goran Petrovski, Tőzsér József, Csősz Éva: A proliferatív vitreoretinopátiában szerepet játszó fehérjék vizsgálata proteomikai módszerekkel, Bolyai konferencia, Budapest, 2014. *

Gergő E. Kovács, Bence Farkas, János A. Mótyán, Alíz Varga, Gergő Kalló, Éva Csősz, Szilvia Benkő, József Tőzsér: Studies on the human NOD-like receptor family CARD domain containing 5 (NLRC5) protein, 7th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Galyatető, 2014. *

G. Kalló, J. Tőzsér, É. Csősz: Determination of Penicillium Antifungal Protein (PAF) concentration in complex biological samples using mass spectrometry based method, 6th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Galyatető, 2013.

B. Sipos, G. Kalló, É. Csősz, A. Csutak, J. Tőzsér: Proteomic analysis of tears from patients with diabetic retinopathy, 6th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Galyatető, 2013. *

Zs. Pató, G. Kalló, G. Petrovski, J. Tózsér, É. Csósz: 2D electrophoresis of vitreous body from mice with proliferative vitreoretinopathy, 6th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Galyatető, 2013. *

G. Kalló, C. Szemcsák, É. Csósz, J. Tózsér: Brain tumor protein quantification by targeted proteomic approach – method development, 6th Central and Eastern European Proteomics Conference, Budapest, 2012.

É. Csósz, A. Csutak, G. Kalló, B. Újhelyi, A. Berta, J. Tózsér: Quantitative proteomics analysis of tears from patients with Alzheimer disease, 6th Central and Eastern European Proteomics Conference, Budapest, 2012.

G. Kalló, C. Szemcsák, É. Csósz, J. Tózsér: Brain tumor protein quantification by targeted proteomic approach – method development, 5th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Galyatető, 2012.

*társszerzős prezentációk

8. Kulcsszavak

Testfolyadék, antimikrobiális és immunmodulátor peptidek/fehérjék, biomarker, kvantitatív proteomika, módszerfejlesztés, könny, verejték, Alzheimer-kór

9. Köszönetnyilvánítás

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

Köszönetemet fejezem ki Fésüs László és Tózsér József professzor uraknak, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet korábbi és jelenlegi vezetőjének a lehetőségért, hogy munkámat az intézet keretein belül végezhettem.

Köszönetet mondok Rajnavölgyi Éva professzorasszonynak és kutatócsoportjának, különösképpen köszönöm Arunima Chatterjee és Tóth Márta segítségét, melyet a defenzinek vizsgálata során nyújtottak.

Hálával tartozom Dr. Csukat Adriennek a kutatócsoportunkkal végzett szoros kollaborációs munkáért, valamint a könnyminták rendelkezésünkre bocsájtásáért.

Köszönetem fejezem ki Dr. Emri Gabriellának a kollaborációért a verejték fehérjéinek vizsgálatában, valamint a közlemény végső formájának elkészítésében való segítségéért.

Szeretném kifejezni köszönetem Dr. George Tsaprailis-nak az Arizonai egyetemről, a jelölés nélküli kvantitások kivitelezéséért és a verejték porteomról szolgáltatott adatokért.

Köszönetet mondok Dr. Emri Miklósnak a statisztikai módszer kifejlesztéséért, mely nélkül az SRM adatok megfelelő interpretálása nem lett volna lehetséges.

Köszönöm a Proteomika Szolgáltató Laboratórium valamennyi korábbi és jelenlegi munkatársának segítségét, különösképpen barátaimnak, Jakob Bernadettnek, Lábiscsák Péternek, Sipos Beátának, Pató Zsuzsannának, Kicska Líviának, Hegedűs Zsuzsannának, Deák Eszternek és Bereczki Kamillának tartozom hálával.

Köszönetet mondok a Retrovirális Biokémia Laboratórium minden munkatársának a segítségükért.

Végül, de nem utolsósorban szeretnék köszönetet mondani a családomnak, akikre mindig számíthattam, és akik mindig támogattak céljaim elérésében.

A kutatás az Új Széchenyi Terv TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001, TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045, TÁMOP 4.2.2.B-15/1/KONV-2015-0001, valamint az Astellas Pharma Kft. pályázata által valósult meg.