

DEBRECENI EGYETEM  
MEZŐGAZDASÁG-, ÉLELMISZERTUDOMÁNYI ÉS KÖRNYEZETGAZDÁLKODÁSI KAR  
ÁLLATTUDOMÁNYI, BIOTECHNOLÓGIAI ÉS TERMÉSZETVÉDELMI INTÉZET

**ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

*Doktori Iskola vezető:*

**Dr. Kovács András**  
egyetemi tanár, az MTA doktora

*Témavezető:*

**Dr. Jávor András**  
egyetemi tanár, CSc

**GAZDASÁGI ÁLLATFAJOK VIZSGÁLATA  
PROTEOMIKAI MÓDSZEREK ALKALMAZÁSÁVAL**

*Készítette:*

**Gulyás Gabriella**  
doktorjelölt

**Debrecen**

**2014.**

# **Gazdasági állatfajok vizsgálata proteomikai módszerek alkalmazásával**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
az állattenyésztési tudományok tudományágban

**Írta: Gulyás Gabriella okleveles molekuláris biológus**

Készült a Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskolája  
(Szaporodásbiológia, Genomika Doktori Programja) keretében

**Témavezető: Dr. Jávor András egyetemi tanár**

## **A doktori szigorlati bizottság:**

elnök: Dr. Kovács András egyetemi tanár, DSc

tagok: Dr. Bodó Imre egyetemi tanár, DSc

Dr. Bodó Szilárd tudományos munkatárs, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2013. április hó 26. nap

## **Az értekezés bírálói:**

Dr. Bősze Zsuzsanna tudományos tanácsadó, Dsc

Dr. Karaffa Erzsébet Mónika egyetemi docens, PhD

## **A bírálóbizottság:**

elnök: Dr. ....

tagok: Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

Az értekezés védésének időpontja: 2014.....

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	<b>1</b>
<b>VEGYSZEREK JEGYZÉKE</b> .....	<b>2</b>
<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	<b>3</b>
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	<b>5</b>
<b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	<b>6</b>
3. 1. Proteom, proteomika.....	6
3. 2. Proteomika az állattenyésztésben .....	7
3. 3. Gél-alapú proteomikai vizsgálatok .....	10
3. 3. 1. Mintaelőkészítés.....	11
3. 3. 2. Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D-PAGE) .....	12
3. 3. 3. Fehérjék detektálása .....	15
3. 3. 4. Gélelemző szoftverek.....	16
3. 3. 4. Fehérjék azonosítása tömegspektrometriával.....	16
3. 4. Házityúk máj proteomjának változása szelén indukció hatására.....	19
3. 4. 1. A szelén élettani hatásai .....	19
3. 4. 2. A máj funkciói és fehérje összetétele .....	21
3. 5. Különböző genotípusú növendék kosok hosszú hátizom szövetének proteomikai elemzése.....	23
3. 5. 1. Fajtaösszehasonlító vizsgálatok.....	23
3. 5. 2. A cigája .....	24
3. 5. 3. A szapora merinó .....	25
3. 5. 4. A vázizom fehérje összetétele .....	27
3. 6. Különböző élősúlyban levágott charolais bikák vázizom szövetének proteomikai vizsgálata .....	28
3. 6. 1. A charolais fajta .....	28
3. 6. 2. A vágáskori élősúly és a hús minőségi és mennyiségi tulajdonságainak kapcsolata.....	29
<b>4. ANYAG ÉS MÓDSZER</b> .....	<b>32</b>
4. 1. Házityúk máj proteomjának változása szelén indukció hatására.....	32
4. 1. 1. Állatok és kezelés.....	32
4. 1. 2. Mintavétel.....	32
4. 1. 3. Fehérjék izolálása.....	33
4. 1. 4. Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D-PAGE) .....	34
4. 1. 5. Gélképek analízise.....	37
4. 1. 6. Fehérjék azonosítása.....	38
4. 2. Különböző genotípusú növendék kosok hosszú hátizom szövetének proteomikai elemzése.....	39
4. 2. 1. Állatok és kezelés.....	39
4. 2. 2. Mintavétel.....	39
4. 2. 3. Fehérjék izolálása .....	40
4. 2. 4. Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D-PAGE) .....	40
4. 2. 5. Gélképek analízise.....	43
4. 2. 6. Fehérjék azonosítása.....	43
4. 3. Különböző élősúlyban levágott charolais bikák vázizom szövetének proteomikai vizsgálata .....	45
4. 3. 1. Állatok és kezelés.....	45

4. 3. 2. Mintavétel.....	45
4. 3. 3. Fehérjék izolálása és jelölésük CyDye fluoreszcens festékekkel .....	46
4. 3. 4. Kétdimenziós differenciáló gélelektroforézis (2D-DIGE) .....	47
4. 3. 5. Géleképek analízise.....	49
4. 3. 6. Fehérjék azonosítása.....	51
<b>5. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK .....</b>	<b>52</b>
5. 1. A házityúk máj proteomjának változása szelén indukció hatására .....	52
5. 1. 1. A házityúk máj kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézisének optimalizálási eredményei .....	52
5. 1. 2. A kontroll és a kezelt csoport máj proteomjának összehasonlítása során kapott eredmények .....	57
5. 2. Különböző genotípusú növendék kosok hosszú hátizom szövetének proteomikai elemzése.....	67
5. 2. 1. Juh hosszú hátizom kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézisének optimalizálási eredményei .....	67
5. 2. 2. A cigája és szapora merinó fajták között fehérjeszinten mutatkozó különbségek.....	71
5. 3. Különböző élősúlyban levágott charolais bikák vázizom szövetének proteomikai vizsgálata .....	81
5. 3. 1. Szarvasmarha vázizom kétdimenziós differenciáló gélelektroforézisének optimalizálási eredményei .....	81
5. 3. 2. Az 500 és 700 kg-os élősúlyban levágott charolais bikák vázizom proteomjának összehasonlítása során kapott eredmények .....	85
<b>6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK .....</b>	<b>92</b>
<b>7. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA .....</b>	<b>94</b>
<b>8. ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>95</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>99</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>127</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>127</b>
<b>NYILATKOZATOK .....</b>	<b>129</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2D-PAGE	kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis
ADP	adenozin-difoszfát
ATP	adenozin-trifoszfát
BSA	marha szérum albumin
CBB	comassie brilliant kék
CE	kapilláris elektroforézis
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)-dimetilammónium]-1-propánszulfonát
DIGE	differenciáló gélelektroforézis
DNS	dezoxiribonukleinsav
DTT	dithiotreitol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
GTP	guanozin-trifoszfát
HPLC	nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
HSP	hősokk fehérje
IPG	immobilizált pH grádiens
LC	folyadékkromatográfia
MALDI	mátrix segített lézer deszorpciós ionizáció
MLC	miozin könnyű lánc
MS	tömegspektrométer
MW	molekulasúly
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
pI	izoelektromos pont
RNS	ribonukleinsav
SDS	nátrium dodecil szulfát
SNP	egyponos nukleotid polimorfizmus
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TOF	repülési idő
V%	intenzitás %

## VEGYSZEREK JEGYZÉKE

2-D Cleanup Kit (Bio-Rad)	TEMED (Sigma-Aldrich)
acetonitril (Sigma-Aldrich)	thiourea (Sigma-Aldrich)
agaróz (Lonza)	trifluorecetsav (Sigma-Aldrich)
akrilamid/biszakrilamid (37,5:1) (Sigma-Aldrich)	tripszin (Promega)
alumínium szulfát-(14-18)-hidrát (Sigma-Aldrich)	tris – glicin – SDS puffer 10X (Lonza)
ammónium bikarbonát (Sigma-Aldrich)	tris (VWR)
ammónium perszulfát (Sigma-Aldrich)	urea (Sigma-Aldrich)
Bio-Lyte ampholyte (Bio-Rad)	
brómfenol kék (Bio-Rad)	
BSA (Sigma Aldrich)	
CBB G-250 (Thermo Scientific)	
CHAPS (Sigma-Aldrich)	
Coomassie Bio-Safe (Bio-Rad)	
CyDye DIGE Fluor Kit (GE Healthcare)	
DeStreak (Sigma-Aldrich)	
DTT (Bio-Rad)	
ecetsav (Sigma-Aldrich)	
EDTA (VWR)	
ezüst nitrát (Sigma-Aldrich)	
formaldehid (Sigma-Aldrich)	
hangyasav (Sigma-Aldrich)	
iodoacetamid (Sigma-Aldrich)	
kálium ferricianid (Sigma-Aldrich)	
lizin (Sigma-Aldrich)	
metanol (VWR)	
nátrium karbonát (Sigma-Aldrich)	
nátrium tioszulfát (Sigma-Aldrich)	
ortofoszforsav (Sigma-Aldrich)	
Pierce Silver Stain Kit (Thermo Scientific)	
proteáz inhibitor koktél (Fermentas)	
RC DC Protein Assay Kit (Bio-Rad)	
SDS (VWR)	

# 1. BEVEZETÉS

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.

A modern genetika kialakulása az 1980-as évekre tehető, ebben az időszakban terjedt el a marker alapú szelekció használata is az állattenyésztésben. Ennek a szelekciós eljárásnak a lényege az, hogy egy gént vagy markert kapcsolatba hoznak valamilyen gazdaságilag fontos tulajdonsággal, majd kiválogatják azokat az egyedeket, melyek a kedvező polimorfizmust hordozzák, és azokat vonják be a további tenyésztésbe (DEKKERS, 2004). A genetika történetében a következő mérföldkőnek az 1990-es évek közepén elindított teljes genom szekvenálások tekinthetők. Ettől kezdve egyre több élőlénynek, köztük gazdasági állatnak is, elkészült a géntérképe. Ezek a kutatások már a genomika tárgykörébe tartoznak, hiszen így már nemcsak izolált gének vizsgálata válik lehetővé, hanem arról is információt kaphatunk, hogy ezek a gének hogyan befolyásolják egymás működését, ezáltal szabályozva az élőlényekben lejátszódó komplex biológiai folyamatokat. A genomika sikertörténete itt még nem ért véget, hiszen napjainkban például már általános az olyan DNS chipek használata, melyek akár 50.000 SNP detektálására is alkalmasak (AHMED és KHOSA, 2010)

Látható, hogy viszonylag rövid idő alatt, milyen 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 (KADARMIDEEN és mtsai, 2006). Az „omikák” alapjaiban változtathatják meg az állattenyésztés gyakorlatát, hiszen figyelembe veszik a kívánatos fenotípus hátterében álló szabályozási hálózatokat és útvonalakat is.

Sok kutató gondolja úgy, hogy a XXI. század már a proteomikai kutatások kora lesz. Ez alatt persze nem azt értik, hogy abba kellene hagyni a különböző genomok szekvenálását, vagy a kapott szekvenciák értékelését. Mindössze arról van szó, hogy a genomi információ megszerzésének útjában álló technikai akadályokat lényegében sikerült elhárítani. A következő nagy kihívás a proteomok - az adott időpillanatban a

sejtben található fehérjék összességének - megértése lesz (CAMPBELL és HEYER, 2003).

A proteomika alkalmazása ezidáig a humán gyógyászatban és gyógyszerészetben terjedt el szélesebb körben. Az állattenyésztésben a proteomikai módszerek felhasználása még korlátozott. Nagy kihívást jelent a gazdasági állatfajok különböző szöveteinek proteom analízise, hiszen a fehérje összetételben mutakozó 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 előállítását segítheti.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

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.

### **3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

#### **3. 1. Proteom, proteomika**

Sem a genomiális DNS, sem az expresszáladott mRNS nem ad olyan pontos képet a sejtek állapotáról, mint a fehérjék. Ennek oka, hogy a gének jelen lehetnek ugyan, de nem biztos, hogy átíródnak, és az mRNS kópiák száma nem mindig tükrözi a funkcionális fehérjék számát (CELIS és mtsai, 2000).

A proteom, egy adott sejt, szövet, szerv vagy szervezet teljes fehérjékészletét jelenti egy adott időpontban. Ez a fogalom először 1994-ben Marc Wilkins által került leírásra Olaszországban. A proteom működésének megértéséhez szükséges az azt alkotó fehérjék azonosítása és más molekulákkal való interakciójának megismerésére. A proteomika elsősorban azokkal a problémákkal foglalkozik, melyeket a DNS analízissel nem tudunk megoldani (STAGSTED és mtsai, 2004).

A proteomika igen összetett tudományterület, mely többek között vizsgálja a fehérjék szerkezetét, biológiai funkcióját és ezek térbeli és időbeli változását. Nemcsak úgy tekinti a fehérjét, mint izolált molekulát, hanem figyelembe veszi a fehérje és környezete közötti kölcsönhatásokat is (HUDECZ, 2003).

Más módszerekkel ellentétben, melyek egy időben mindössze néhány fehérje meghatározását végzik, a proteomikai vizsgálatokkal lehetőség nyílik egy mérésen belül több ezer fehérje meghatározására, így nyomon követhetjük a sejtek dinamikus válaszait a környezetük megváltozására. A proteomika célja, hogy kísérleti kezelések során azonosítsa az új, illetve nem várt változásokat a fehérjék expressziójában, meghatározza a kölcsönhatásokat és módosulásokat, valamint teljes képet mutasson a sejtben lejátszódó folyamatokról (LIPPOLIS és mtsai, 2008).

A proteomikai vizsgálatok gyakorlati célokra történő felhasználása egyre inkább terjedőben van. Elsősorban a humán gyógyászatban használják az egyes betegségek patofiziológiájának megismerésére, illetve lehetséges biomarker fehérjék detektálására, melyek segítségével a betegségek már korai szakaszban felismerhetővé válnak. Az állattenyésztésben, a növénytermesztésben és az élelmiszeriparban egyaránt növekvő igény mutatkozik az ilyen jellegű vizsgálatokra.

### 3. 2. Proteomika az állattenyésztésben

A kétdimenziós gélelektroforézis kifejlesztése, és a tömegspekrometria fehérje azonosításban történő felhasználása óta, hatalmas eredményeket értek el a proteomikai technológiákban, mindezek ellenére alkalmazásuk az állattenyésztésben még mindig korlátozott. Ez tulajdonképpen meglepő, hiszen az állattenyésztés fő célja, hogy elsődleges fehérje forrást biztosítson táplálkozásunkban, ezért is lenne szükséges, hogy ezeket a fehérje vizsgálati módszereket az állattenyésztési tudományok valamint az élelmiszeripari fejlesztések és kutatások területén is használjuk (ECKERSALL és mtsai, 2012). A technika fejlődésével és a tudásanyag növekedésével a proteomikai módszerek gyakorlati felhasználása kezd teret hódítani, hiszen egyre nagyobb igény mutatkozik a fenotípusos, fiziológiai, patofiziológiai és termelési mutatók mélyebb megértésére (BENDIXEN és mtsai, 2010a).

Az állattenyésztésben jelenleg fiziológiai, immunológiai, szaporodásbiológiai, hús- és tejtermelés biológiai kísérletekben használnak proteomikai vizsgálatokat. Sejtek, sejtorganellumok, 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 (LIPPOLIS és mtsai, 2008).

A hús- és tejtermékek tekinthetők az elsődleges fehérjeforrásnak a humán táplálkozásban. A hús- és tejiparban a végtermékek minősége elsősorban a nyersanyagtól függ, így a termék minősége közvetlen kapcsolatban áll a nyersanyagot alkotó fehérjék szerkezetével és funkciójával (CANDEK–POTOKAR és mtsai, 2002). Egyre több proteomikai tanulmány lát napvilágot, melyek azt vizsgálják, hogy milyen hatással van az élelmiszer a fogyasztók egészségére és életfolyamataira, illetve hogy a feldolgozási folyamatok során hogyan változik az élelmiszerek fehérje összetétele. Nagy a kereslet a proteom-alapú markerek iránt mindkét iparágban (hús és tej), hiszen ezek segítségével a termékek minőségének pontozása és a rangsorolása lehetővé válik. Az élelmiszer előállítás kapcsán ún. technológiai markerek is használhatók, melyek az ipari folyamatok monitorozásában nyújtanak segítséget, ezáltal elősegítve a maximális teljesítmény elérését (HAN és WANG, 2008).

A hús táplálkozás-élettani szempontból kedvező aminosav-összetételű, magas biológiai értékű fehérjét és emellett hasznos ásványi anyag komponenseket, mikroelemeket és vitaminokat is tartalmaz (HAJÓS, 2000). A szűkebb értelemben vett izomszövet 15-25%-a fehérje, mely a vágóállatok faja, fajtája, takarmányozása, életkora és neme függvényében változik. Minden biológiai tulajdonság és mechanizmus szigorú ellenőrzés alatt áll, mely kapcsolatban van a gének és fehérjék komplex szabályozásával. A hús minősége szoros összefüggésben van az élő állat más biológiai tulajdonságaival, ezért is foglalkoztatta a kutatókat, hogy meghatározzák a húsminőség sokféleségének hátterében álló jelenségeket, mint például a hús porhanyóssága vagy víztartó képessége. Egyre inkább világossá vált, hogy a hús minősége összetett, számos gén által befolyásolt folyamatok eredménye (BENDIXEN, 2005). Ezért vált szükségesszerűvé, olyan kísérleti szemléletmódok és technológiák alkalmazása, mellyel lehetőség nyílik arra, hogy egyidejűleg több gént, ill. fehérjét tudjanak meghatározni, így egyre gyakrabban folyamodnak proteomikai és funkcionális genomikai eszközökhöz.

Legnagyobb kihívás a húsminőség javításának szempontjából a hús porhanyósság sokféleségének megértése. Habár már számos biokémiai faktort és QTL-t (Quantitative Trait Locus) ismerünk (MALTIN és mtsai, 2003), melyek meghatározzák a hús porhanyósságát, de a komplex postmortem folyamatokat, beleértve a proteolízist és a szolubilis izomfehérjék kölcsönhatásait, a nagyon korai postmortem fázis pH változását és ion transzportját, valamint mindezek hatását a hús szerkezetére, még nem sikerült teljesen megfejteni. Hasonló a helyzet a hús víztartó képességének molekuláris mechanizmusával és az izom növekedésének és fejlődésének hatásával a húsminőségre (HOLLUNG és mtsai, 2007).

Ahogy a hús, úgy a tej és tejtermékek proteom analízise is elkezdődött az elmúlt években. A legfontosabb tejfehérjék közé az  $\alpha$ s1-kazein, az  $\alpha$ s2-kazein, a  $\beta$ -kazein, a  $\kappa$ -kazein, a  $\beta$ -laktalbumin, a  $\beta$ -laktoglobulin és az immunoglobulinok tartoznak, melyek vizsgálata során megállapították, hogy a sokféle poszttranszlációs módosítás teszi a tejproteomot különösen összetetté (O'DONELLA és mtsai, 2004). Proteomikai módszerekkel elsősorban a tejfehérjék foszforilációjának, glikozilációjának és proteolízisének tanulmányozása folyik. Elsődlegesen, de nem kizárólagosan a kazeinek vizsgálata során tanulmányozták részletesebben a poszttranszlációs módosításokat (MANSO és mtsai, 2005).

A tej- és tejtermékek proteomikai vizsgálata esetén mindig komoly kihívást jelent a nagy gyakoriságú fehérjék csökkentése (kazeinek), ill. a kis számban előforduló fehérjék feldúsítása. Erre alkalmas megoldás a kombinatorikus peptid ligand könyvtárak használat, melyeket nagyszámú, kismolekulájú vegyületekből állítanak elő (ZHANG és CARPENTER, 2013).

A tej alapú proteomikai vizsgálatokban gyakran a tejszírcseppek membránjának fehérje összetételét vizsgálják. Ez tulajdonképpen a tőgy epithelsejt membránját jelenti, melyhez a sejt citoplazmájából is kapcsolódnak fehérjék. Ezen membránok vizsgálatával invazív beavatkozás nélkül kaphatunk információt a tőgy patofiziológias állapotáról a laktáció ideje alatt (REINHARDT és LIPPOLIS, 2006).

A betegségek tanulmányozása során, a szövetek és testfolyadékok monitorozásával lehetőség nyílik a patofiziológias reakciók megismerésére. Akárcsak az embereknél, úgy az állatoknál is nagyon fontos a betegségek korai felismerése. Az adott betegséghez kapcsolható biomarker molekulák segítségével már szubklinikia állapotban is azonosíthatóvá válhat a vizsgált betegség. Szarvasmarhák esetén a masztitisz (SMOLENSKI és mtsai, 2007; DANIELSEN és mtsai, 2010), sertéseknél a bélrendszerhez kapcsolódó betegségek azok (DANIELSEN és mtsai, 2006; DANIELSEN és mtsai, 2007), melyeket proteomikai módszerekkel eddig tanulmányoztak.

Humán betegségek modellezésére gyakran használnak sertéseket (PHILIPS és mtsai, 1982; LARSEN és mtsai, 2004), a fehérjék analizálásával elsősorban emésztési betegségek, neurodegeneratív rendellenességek, az elhízás és metabolikus zavarok tanulmányozását végzik ebben a fajban (PANG et. al., 2007; AIGNER et. al., 2010; BENDIXEN et. al., 2010b).

A gazdasági állatfajok esetén is régóta kutatott területnek számít a stresszválasz fiziológiája és molekuláris háttere. Természetesen a proteomika látószögébe is bekerült a stresszválasz tanulmányozása. Gyakran vizsgált jelenség a veleszületett immunitás stressz általi gátlása, elsősorban szarvasmarha fajok esetén. A glükokortikoidok indukálta immunszupresszióról (BURTON és KEHRLI, 1995) például megállapították, hogy borjaknál növeli a légzőrendszeri betegségek kialakulásának esélyét, illetve azonosítottak olyan fehérjéket is, melyek a betegség kialakulásának kockázatát csökkentik (LIPPOLIS és mtsai, 2006; MITCHELL és mtsai, 2007).

### 3. 3. Gél-alapú proteomikai vizsgálatok

A proteomikai vizsgálatok során számos bonyolult módszert kombinálhatunk a fehérjék azonosítására és mennyiségi meghatározására (DUTT és mtsai, 2000). Lehetőségünk van nem gél-alapú és gél-alapú módszerek használatára egyaránt.

A nem gél-alapú vizsgálatok során a fehérje elegyből enzimek segítségével egy peptid keveréket állítunk elő, a peptidek elválasztására folyadék kromatográfiát (LC) vagy kapilláris elektroforézist (CE) használhatunk, majd tömegspektrometriával azonosítjuk a kívánt peptideket.

A gél alapú vizsgálatok során az egy- vagy kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézist (1D- vagy 2D-PAGE), illetve ezek alternatíváit használhatjuk a fehérjék elválasztására, majd a számunkra érdekes proteineket enzimes hidrolízist követően tömegspektrometriával azonosíthatjuk.

A gél alapú proteomikai vizsgálatok alapját képező kétdimenziós gélelektroforézis metodika alkalmazása az 1970-es évekre nyúlik vissza, ebben az időszakban kezdték létrehozni a fehérje adatbázisokat. O'Farell alkalmazta elsőként ezt a módszert az *Escherichia coli* radioaktívan jelölt fehérjéinek vizsgálatára, ezzel a metodikával akár több ezer fehérje is kimutatható (O'FARELL, 1975). Az 1990-es években fejlesztették ki a biológiai tömegspektrometriát, mint hatékony analitikai módszert a fehérjék azonosítására, mely véglegesen ledöntötte a korlátokat a fehérjék analízisében (BURLEY és mtsai, 1999).

A kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis legfontosabb lépései:

- fehérjék izolálása, oldatba vitele (mintaelőkészítés)
- prefrakcionálás: sejten való lokalizáció, molekulatömeg, izoelektromos pont, oldhatóság vagy a fehérjék gyakorisága alapján (opcionális lépés)
- első dimenziós elválasztás az izoelektromos pont alapján
- ekvibrálás
- második dimenziós elválasztás a molekulatömeg alapján
- gélek festése

### 3. 3. 1. Mintaelőkészítés

A kétdimenziós gél alapú vizsgálatok sikerességét nagymértékben befolyásolja a minta előkészítése (MOLLOY, 2000). A hatékony mintaelőkészítés megakadályozza a fehérjék aggregációját, az enzimátikus és kémiai módosításokat a fehérjék szerkezetében, eltávolítja a nukleinsavakat és más interferáló molekulákat. Mivel a mintaelőkészítés nemcsak fajonként, hanem szövetenként is eltérő, ezért mindig nagy gondot kell fordítanunk arra, hogy megtaláljuk az optimális beállításokat, melyek segítségével a későbbiekben a legtöbb egyedi fehérjét tudjuk azonosítani a poliakrilamid géleken.

A minták előkészítésénél használt detergensok, amfolitok, redukáló ágensek és kaotrópikus sók koncentrációjának módosításával nagy változásokat érhetünk el a kétdimenziós mintázatban (JEFFERIES, 2005). A mintatisztítás során használt legfontosabb vegyszerek:

Detergensok: szétszakítják a hidrofób kötéseket és növelik a fehérjék szolubilitását. A detergensok nem ionos vagy ikerionos vegyületek, így a fehérjék szabadon migrálhatnak a saját töltésüknek megfelelően. Nem ionos például az octylglukozid, ikerionos például a 3-[(3-kolamidopropil)-dimetilammónium]-1-propánszulfonát (CHAPS) (RABILLOUD, 1999).

Kaotrópikus sók: az urea és a thiourea a leggyakrabban használt kaotrópikus só a mintaelőkészítésnél. Megbontják a makromolekulák háromdimenziós szerkezetét, ezenkívül a thiourea segít oldatba vinni az egyébként nehezen oldható fehérjéket. Az urea és a thiourea is a hidrogénkötéseket bontja, akkor használják őket, amikor a hidrogénkötések nem kívánt aggregációt vagy formációt okoznának a másoddimenziós struktúrában, ezzel befolyásolva a fehérjék mobilitását (RABILLOUD, 1999).

Amfolitok: segítik kiegyensúlyozni az elégtelen só koncentrációt a mintákban. Az amfolitok amfoter molekulák, savas és bázikus csoportokat is tartalmaznak. Stabilizálják a pH grádienszt a fókuszálásnál (RAHIMPOUR és mtsai, 2007).

Redukáló ágensek: leggyakrabban használt redukáló ágens a dithiothreitol (DTT),

erősen redukálja a diszulfidkötéseket, a thiol csoportokat pedig redukált állapotban tartja. Közismert redukáló ágens még a tributilfoszfin (TBP), melyet nehéz kezelhetősége miatt ritkábban használnak a laboratóriumi gyakorlatban (INTERNET 1).

DeStreak reagens: csökkenti a nem specifikus oxidációs reakciókat a fehérjék között, emellett mérsékelheti a kétdimenziós poliakrilamid gélek bázikus régiójában gyakran előforduló vízszintes csíkozottságot, így jelentősen növelve a reprodukálhatóságot. Általában DTT helyett használják.

A proteomikai vizsgálatoknál mindig komoly problémát jelent a minták komplexitása, hiszen egy-egy szövettípus akár több ezer különböző fehérjét is tartalmazhat. Ezért is okoz nehézséget, hogy megtaláljuk azokat a fehérjéket, melyek ténylegesen reagálnak az általunk elvégzett kezelésre. A minták előkészítése során ezt az összetettséget prefrakcionációval csökkenthetjük, ezáltal növekedhet a detektálható fehérjék száma. Számos frakcionálási módszer közül választhatunk, melyek alapjául a fehérje molekulák különböző fizikai és kémiai tulajdonságai szolgálnak, mint például a fehérjék oldhatósága, sejten belüli lokalizációja, mérete, töltése, izoelektromos pontja (MATT és mtsai, 2008).

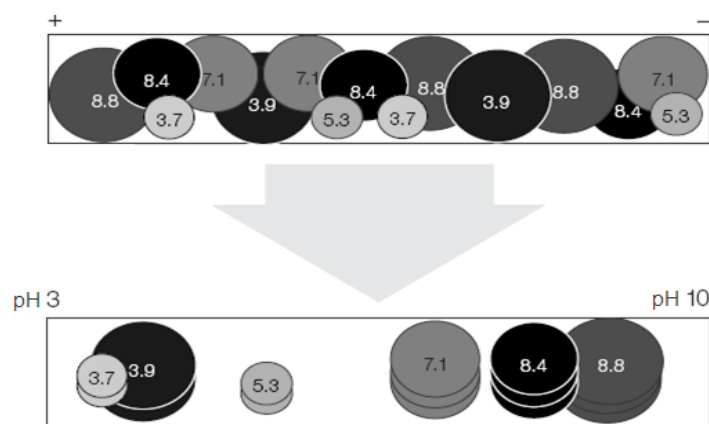
### **3. 3. 2. Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D-PAGE)**

A gél alapú proteomikai vizsgálatok során leggyakrabban használt módszer a kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis. Habár a proteomika kifejezés csak 1995-től terjedt el, a kétdimenziós gélelektroforézist már 1975 óta használják a fehérjék expressziós szintjének monitorozására (O'FARRELL, 1975). Az elektroforézis széleskörű alkalmazhatósága és nagy felbontóképessége miatt az egyik leggyakrabban használt technika a fehérjék elválasztására (HAJÓS és IDEI, 2001).

A fehérjék első dimenzióban történő elválasztása az izoelektromos pontjuk alapján történik, az izoelektromos fókuszáló berendezés segítségével. Az izoelektromos pont (pI) az a pH érték, amelynél a pozitív és a negatív töltések kiegyenlítik egymást, azaz az aminosav neutrális viselkedést mutat elektromos térben. A legtöbb fehérje izoelektromos pontja pH 3-12 tartományba esik. Amikor a fehérjéket olyan közegbe helyezük, ahol előzőleg már kialakítottunk egy pH grádienszt, akkor elektromos áram

hatására a fehérjék vándorolni kezdenek ebben a gradiensben és eközben vagy protonokat vesznek fel vagy protonokat adnak le. Végül elérnek egy olyan pontot a pH gradiensben, mely megegyezik az izoelektromos pontjukkal (1. ábra).

A laboratóriumi gyakorlatban mára már széleskörben elterjedt az ún. immobilizált pH gradiens (IPG) használata, melyek felváltották a korábban használt ún. cső géleket (amfolit alapú gradiens). Ezekben a vékony poliakrilamid gél csíkokban (stripek) egy már előre kialakított pH gradiens található kovalensen beépítve az akrilamid mátrixába. Az IPG stripek különböző méretben és pH tartományban beszerezhetők, illetve a pH gradiens linearitásában is (lineáris, nem lineáris) eltérhetnek egymástól. Használatuk során, első lépésben rehidratálnunk kell a gélcsíkokat, hogy elérjék eredeti vastagságukat. Ez történhet aktív (alacsony feszültség használatával) vagy passzív (csak a fehérjék abszorpcióját kihasználva) módon valamilyen rehidratáló oldattal, mely már tartalmazhatja magát a fehérje mintát is. Az IPG stripek használatának számos előnyét lehet megemlíteni, ilyenek a jó ismételtetés, könnyű kezelhetőség, valamint, hogy nagy mennyiségű fehérje elválasztására alkalmasak (HERBERT, 2005).



**1. ábra: A fehérjék izoelektromos pont szerinti elválasztása**

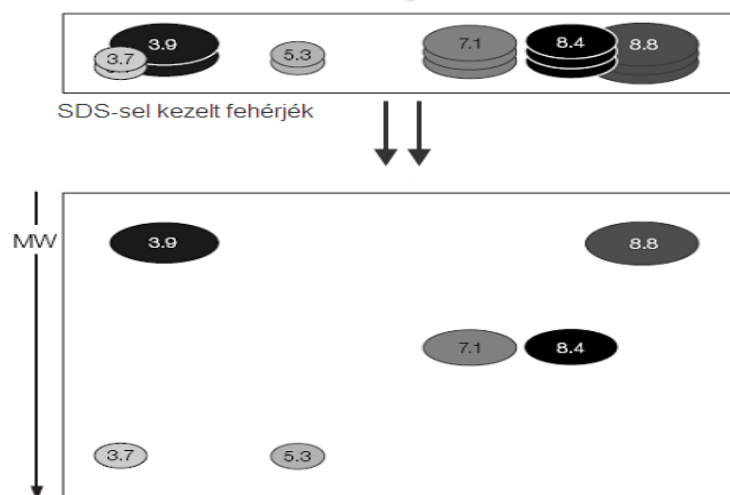
(Forrás: INTERNET 1)

A fókuszált fehérjék szolubilizálásához és a nátrium-dodecil szulfát (SDS) burok kialakításához elengedhetelen, hogy a molekulatömeg szerinti elválasztást megelőzően SDS-tartalmú pufferekben ekvilibráljuk a fehérjéket. Az SDS egy anionikus detergens, mely elmaszkírozza az egyes fehérjék valódi töltését és egységes negatív töltést ad nekik, így azok csak a molekulásúlyuk alapján különböznek egymástól. Az ekvilibrálás lépésben történik meg a cisztein oldalláncok redukálása és alkilálása is. A cisztein

oldalláncok szulfhidril csoportjának redukálása egy DTT tartalmú pufferben játszódik le, majd a már redukált csoportok alkilálását végezzük el egy iodoacetamidot tartalmazó puffer segítségével (INTERNET 1).

Az így előkészített fehérjék már alkalmasak arra, hogy molekulatömeg szerint elválasszuk őket. Az ekvilibrált IPG stripeket egy kis koncentrációjú agaróz gél segítségével helyezzük el a második dimenziós elválasztást biztosító poliakrilamid gélek tetején. Az agaróz gél biztosítja, hogy a fehérjék akadálytalanul tudjanak vándorolni a stripből az SDS-tartalmú poliakrilamid gélbe.

A második dimenzióban az elválasztás egy SDS tartalmú poliakrilamid gélben történik. A már előzőleg a pI alapján elkülönített fehérjéket tovább szeparáljuk a molekulásúlyuk (MW) alapján. Az SDS-sel burkolt fehérjék negatív töltésűek, így a poliakrilamid gél pórusainak szűrő hatására méret szerint elkülöníthetők egymástól (2. ábra). A poliakrilamid gélek pórus méretét a gélben található akrilamid és biszakrilamid (N,N'-metilén-biszakrilamid) koncentrációja (%T) határozza meg. Az akrilamid vizes közegben képes a polimerizációra, amely során különféle méretű lineáris poliakrilamid-szálak keletkeznek. A biszakrilamid szolgál keresztkötő reagensként, mely képes összekapcsolni a poliakrilamid-szálakat. Az akrilamid polimerizációjának és a keresztkötések kialakulásának sebességét a szabadgyökök jelenléte megnöveli, ezért alkalmaznak a gélek készítése során szabadgyök képző ammónium-perszulfátot (APS) és a szabadgyököket stabilizáló tetrametilén-diamint (TEMED) (POSCH, 2008).



**2. ábra: A fehérjék molekulásúly szerinti elválasztása**

(Forrás: INTERNET 1)

### 3. 3. 3. Fehérjék detektálása

A fehérjék detektálásának hagyományos módja valamilyen festési eljárás. A leggyakrabban az ún. Coomassie (érzékenység: 10 ng/fehérjefolt) festést alkalmazzák, ennek az az oka, hogy egyszerű, olcsó, ugyanakkor tömegspektrometriával kompatibilis festék.

A Coomassie festésnek két alaptípusa ismert, de ezeket gyakran módosítják a szenzitivitás növelésének érdekében. Az R-250 formáját ún. regresszív festési módszerrel alkalmazzák. Első lépésében magát a poliakrilamid gélt telítik a festékkel, majd mosási lépésekkel halványítják a háttérrel, erre azért van lehetőség, mert a festék erősebben kötődik a fehérjékhez, mint a gél mátrixhoz. A G-250 forma esetében ún. progresszív festési eljárást alkalmaznak. Az általában tömény savat (foszforsav), ammónium-szulfátot és metanolt/etanolt tartalmazó kolloid festékoldatban a kolloid, illetve a diszperz formában jelen lévő festékrészecskék egyensúlyban vannak. A festés során a diszperz részecskék átjutnak a mátrixon és a fehérjékhez kötődnek, a kolloid részecskék azonban nem képesek a gélbe jutni, ennek eredményeként a háttér nem festődik (PATTON, 2002).

Ennél érzékenyebb az ezüst-nitráttal vagy fluoreszcens festékkel történő festés (érzékenység: 1 ng/fehérjefolt). A poliakrilamid gélt először ezüsttel telítik, majd eltávolítják a gélmátrixhoz kötött fémionokat és redukálják a fehérjéhez kötött ezüstöt (SHEVCHENKO és mtsai, 1996). A fluoreszcens festékek közül leggyakrabban a SyproRuby festéket használják, ez is tömegspektrométerrel kompatibilis festék.

Immunológiai módszerrel is detektálhatóak a fehérjék, ez az eljárás a Western-blot (CREIGHTON, 1997). A fehérjéket gélről membránra viszik át (blottolás), majd a membránra átvitt fehérjét a rá specifikus jelölt antitesttel detektálják. A fehérjék a membránra történő transzferálást követően részben visszanyerik natív konformációjukat, így alkalmasak fehérje-fehérje és fehérje-ligand kölcsönhatások kimutatására is (ERDŐDI, 2003).

Az egyik legmodernebb gél-alapú eljárás a fehérjék jelölésére és elválasztására a kétdimenziós differenciáló gélelektroforézis (Two Dimensional - Difference In Gel Electrophoresis, 2D-DIGE)

Ennél a módszernél a mintában lévő fehérjéket már a kétdimenziós elválasztás előtt megjelöljük fluoreszcens festékekkel (Cyanine2, Cyanine3, Cyanine5). Külön jelölést kap a kontroll és a kezelt csoport, valamint a belső standard, melyet a kísérletben

szereplő összes minta elegyéből hozunk létre. Így válik lehetségessé, hogy egy gélben fut a kontroll és a kezelt csoport mintája, valamint a belső standard is. Ezek a fluoreszcens festékek más-más hullámhosszon gerjeszthetők, melyek nem fednek át egymással, a jelölés kémiai hátterében az áll, hogy a fehérjék lizin  $\epsilon$ -aminocsoportjával N-hydroxysuccinimide észtert képez a festék (MAROUGA és mtsai, 2005).

Ezzel a módszerrel csökkenthetőek az eltérő futtatásokból eredő különbségek a géleképeken, valamint a belső standard használatával a gélelemzés pontosabbá tehető.

### **3. 3. 4. Gélelemző szoftverek**

Ugyanaz a spot (fehérjefolt a gélen) ugyanolyan futtatási paraméterek mellett sem mindig ugyanott helyezkedik el a gélen. Ennek több oka is lehetséges: inhomogén poliakrilamid, különbségek a hőmérsékletben, különbségek az áramerősségben. Ezáltal nehézkessé válik a géleképek összehasonlítása és az expressziós különbségek detektálása. A gélelemző szoftverek segítségével csökkenthető a festésből adódó háttérzaj, elvégezhető a spotok párosítása (matching), a gélek egymásra illesztése (warping), fúziós gélek létrehozása, a spotok detektálása és kvantifikálása, valamint statisztikai próbák alkalmazása (MILLIONI és mtsai, 2010). A legismertebb szoftverek: Delta2D (Decodon, Germany) PDQuest, ProteomWeaver (Bio-Rad, USA), SameSpots, Progenesis (Nonlinear Dynamics, UK), Decyder 2D (GE Healthcare).

### **3. 3. 4. Fehérjék azonosítása tömegspektrometriával**

A proteomikai vizsgálatokban az elválasztott fehérjék azonosítására nagy érzékenységgű tömegspektrométereket alkalmazhatunk, melyek gázfázisú ionok analízisére alkalmasak. A tömegspektrométerek felépítésében három fő egység vesz részt, ezek az ionforrás, a tömeg analízátor és a detektor (CHAPMAN, 2000).

A tömegspektrométerekben gáz, folyadék vagy szilárd halmazállapotú mintát egyaránt vizsgálhatunk, de a minta típusától függetlenül minden esetben a mintát gázfázisba kell hozni. Az ionforrások teszik lehetővé, hogy a mintákat gázfázisú ionokká alakítsuk. Többféle ionizációs technika létezik, a fehérjék azonosítására azonban leggyakrabban az elektropray ionizációt (Electrospray Ionization - ESI) és a mátrix segített lézer deszorpciós ionizációt (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - MALDI) használják.

Az elektropray ionizáció során a kapillárisból kiáramló folyadék (a minta) a nagyfeszültség miatt töltött cseppek formájában hagyja el a kapillárist. A mintával szemben áramló szárítógáz a benne lévő oldószer gyors párolgását eredményezi, így a cseppek zsugorodnak, de töltésük nem változik. Egy bizonyos térfogat alatt a töltött részecskék Coulomb-féle robbanást okoznak, ezáltal a cseppek kisebb cseppekre esnek szét. A folyamat többször ismétlődik, így mire a mintacseppek a tömegspektrométer bemeneti nyílásához érnek, már nagy valószínűséggel nem tartalmaznak oldószert (ANDERSEN és mtsai, 1996).

A mátrix által segített lézer deszorpciós ionizáció esetén a fehérje mintát egy ún. mátrixszal együtt kristályosítják egy mintatartó lemez felületén. A mátrix egy szerves, UV-abszorbeáló vegyület. A minta-mátrix keverékkel lézer segítségével energiát közölnek, ennek eredményeként a szilárd anyag gáz halmazállapotúvá válik, és a mátrix ionizálódik. A továbbiakban a minta ionizációját a mátrixionok segítik elő (FITZGERALD és mtsai, 1993).

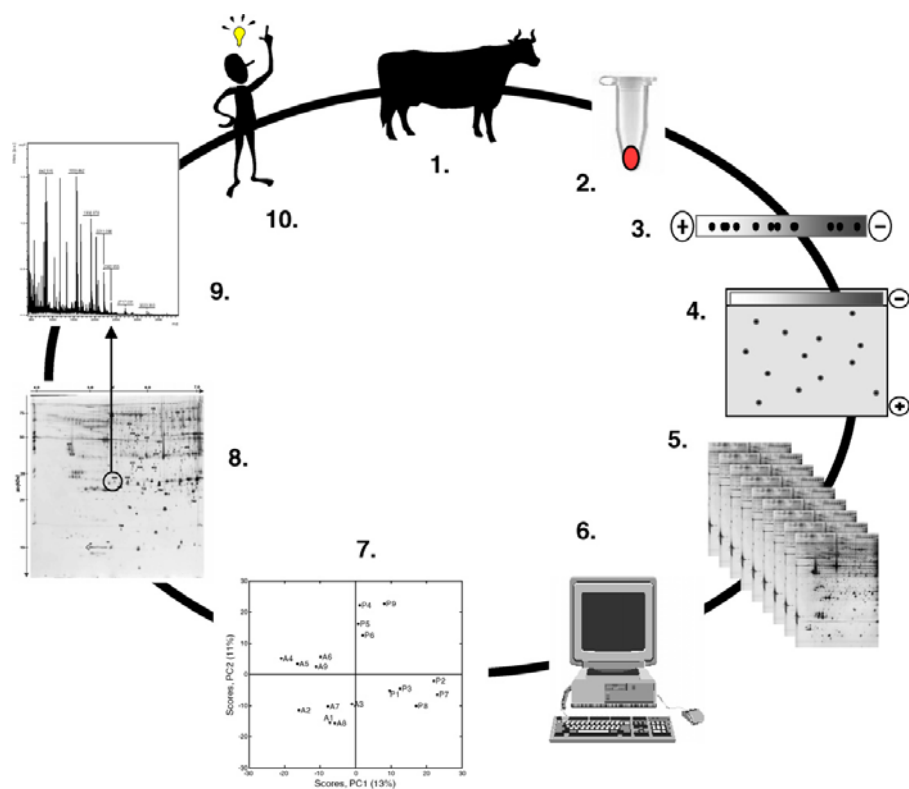
Az ionizációt követően a tömeg analizátorok az ionokat tömeg/töltés arány szerint elválasztják egymástól. A tömeg analizátoroknak többféle típusuk ismeret, attól függően, hogy milyen elven alapul az ionok elválasztása. Gyakran használt analizátorok a repülési idő analizátor (time of flight - TOF), a kvadrupól vagy az ioncsapda.

A detektorba került ionok a detektor típusától függően áramot vagy töltést generálnak, melyeket az adatfeldolgozó rendszer spektrum formájában jelenít meg. A tömegspektrométerekben alkalmazott detektoroknak is több típusuk van, ilyenek például az elektron-sokszorozó vagy az ion-foton detektor.

Az egyszerű tömegspektrométerek egy ionforrást, egy tömeg analizátort és egy detektort tartalmaznak (pl. MALDI-TOF). Ezzel szemben a tandem tömegspektrométerek két vagy több analizátort tartalmaznak (pl. MALDI-TOF-TOF).

A tandem tömegspektrométerek sokkal megbízhatóbban alkalmazhatók a fehérjék szekvencia alapján történő azonosításához. Ehhez a fehérjét először tripszinnel emésztik, a keletkezett peptideket ionizálják és pontos tömegüket meghatározzák, majd bizonyos ionokat kiválasztanak és fragmentálják őket. Az így keletkezett egyszeres töltésű ionok alapján MS/MS spektrumot vesznek fel. Az MS/MS spektrumban levő ionsorozatok alapján meghatározzák a szekvenciát és azonosítják a peptidet, majd a peptidek segítségével a fehérjét (DE HOFFMAN és STROOBANT, 2003).

A 3. ábrán összefoglalva láthatjuk egy gél-alapú proteomikai vizsgálat fontosabb lépéseit.



**3. ábra: Sematikus ábra egy proteomikai vizsgálat lépéseiről, 2D-PAGE és tömegspektrometria alkalmazásával (Forrás: HOLLUNG és mtsai, 2007)**

(1) biológiai minta (2) fehérjék izolálása (3) izoelektromos pont szerinti fókuszálás (4) molekulahúly szerinti elválasztás (5) ismétlések készítése (biológiai, technikai) (6) gélek elemzése (7) expressziós különbséget mutató fehérjék detektálása (8) ezek kivágása a gélből (9) a fehérje spotok azonosítása (10) az eredmények értékelése

### **3. 4. Házityúk máj proteomjának változása szelén indukció hatására**

#### **3. 4. 1. A szelén élettani hatásai**

A szelén esszenciális szerepet játszik a biológiai folyamatokban. Elsődleges feladata a szabadgyökök semlegesítése, tehát az antioxidáns funkció, emellett részt vesz a szervezet védekezőképességének növelésében és a sejthártya stabilizálásában (NAVARRO-ALARCON és CABRERA-VIQUE, 2008). A szabadgyökök olyan molekulák, melyek egy vagy több párosítatlan elektronnal rendelkeznek, emiatt igen fokozott a reakciókészségük, mivel elektronszerzés céljából gyorsan reakcióba lépnek más vegyületekkel (CADENAS, 1989). Az aerob élőlényekben folyamatosan keletkeznek reaktív oxigéngyökök, mint például szuperoxid gyök, hidroxil gyök vagy a hidrogén-peroxid (FRIDOVICH, 1978). Az antioxidánsok oxidációt gátló anyagok, melyek képesek a szabadgyökök semlegesítésére. Az antioxidáns enzimek közül több is szelén-dependens, ezek közül az egyik legfontosabb a glutation peroxidáz (többféle izoformája létezik), mely védi a sejteket és a membránokat az oxidatív stressztől, a lipid hidro-peroxid redukálásával (WATANABE és mtsai, 1997).

Korábban úgy gondolták, hogy a szerves szelénformák (szelено-metionin, szelено-cisztein) a leginkább alkalmas vegyületek a takarmányok szelénszintjének emelésére (THOMSON és STEWART, 1973). Ismert volt az is, hogy szelénformák közül az elemi szelén a legkevésbé mérgező. Kimutatták, hogy bizonyos baktériumok úgy védekeztek a számukra már mérgező mennyiségű szelén hatása ellen, hogy elemi szelént állítottak elő és nano méretű gömböcske formájában tárolták. Az előállított gömbök mérete a baktériumfajtól függően a 100-500 nanométer között változott (ESZENYI és mtsai, 2011). A nano méretű szelénről megállapították, hogy a legkevésbé toxikus, ugyanakkor a legjobban hasznosuló szelénforma (ZHANG és mtsai, 2004).

A szelén, mint mikrotápanyag, elengedhetetlen a gazdasági állatok számára is. Hozzájárul a megfelelő súlygyarapodáshoz és szaporasághoz (hímivar-sejtek érési folyamatát segíti), valamint az immunfolyamatok kialakításában (T-sejtek interleukin-2 receptorainak számát növeli) és a hasnyálmirigy megfelelő működésében is elengedhetetlen a jelenléte (HOFFMANN és mtsai, 2010). A baromfitenyésztésben a szelén hatása kapcsán még külön meg kell említeni a tojások eltarthatóságára és a

tolképződésre gyakorolt pozitív hatását is (CHOCT és mtsai, 2004). A szárnyasok esetén bizonyos szelenoproteinek fontos szerepet játszanak egyes betegségek megelőzésében. A szelén hiányának klasszikus tünete madarakban az „exudatív diathesis”, e betegség során a sejtmembránok és a kapillárisok átteresztőképessége megváltozik, ezért belső ödémák alakulnak ki az állatban (CANTOR és mtsai, 1975). Egy másik a betegség, az ún. hasvízkór (aszцитез), szintén magas elhullást eredményez brojler állományokban (WALTON és mtsai, 1999). Különösen a stresszes körülmények között nevelt, gyorsan fejlődő állatokat érinti ez a kór. Vizsgálatok kimutatták, hogy a szelénnel etetett csoport esetében jelentős mértékben csökkent a hasvízkórból eredő elhullások száma a kontroll állományhoz képest, ez a hatás a szelén antioxidáns funkciójával magyarázható (TAGHIZADEH és mtsai, 2012). A szelénhiány encephalomalacia kialakulását is okozhatja, mely egy kisagyi károsodás (COMBS és HADY, 1991).

Több kutatócsoport is vizsgálta a szelén hatását a baromfihús minőségére. Megállapították, hogy 0,3 mg/kg Se (élesztőből) kiegészítés csökkenti a csepegési veszteséget, javítja a nyers hús oxidatív stabilitását (QUANT és mtsai, 2011). Nano elemi szelén takarmánykiegészítés esetén is súlygyarapodásbeli és húsminőségbeli javulást tapasztaltak, valamint megnövekedett a tápanyag hasznosítás mértéke is (ZHOU és WANG, 2011). STEF és munkatársai (2011) szintén arra a megállapításra jutottak, hogy a szelén hatására csökkent a csepegési veszteség és a tárolás során fellépő minőségi változások mértéke is kisebb volt.

A szelén élettani hatása ambivalens, ugyanis hiányában betegségek alakulnak ki, túladagolása azonban mérgezéshez vezet (GERGELY, 2006). A Magyar Takarmánykódex (INTERNET 2) alapján, a szerves szelénsókra (nátrium-szelenit és nátrium-szelenát) vonatkozó maximálisan adagolható mennyiség 0,5 mg/kg a takarmánykeverékben. Több kutatócsoport meghatározta már a szelén házityúkra vonatkozó LD50 értéket is, de itt nagyon nagy különbségeket figyelhetünk meg az egyes eredmények között. SALYI és munkatársai (1993) 9,7 mg/ttkg-ban, míg például TISHKOV és VOITOV (1989) 24,6 mg/ttkg-ban határozta meg azt a szelén mennyiséget, ami az állatok 50%-nak elhullásához vezet, ezek az adatok a szerves szelénformákra vonatkoznak, mint például a nátrium-szelenit.

Embereknél 40 µg/nap a minimum érték, 55 µg/nap az ajánlott és a 400 µg/nap a még tolerálható maximum érték. Naponta 300 µg szelén bevitel mellett érik el a szelén-

dependens enzimek a maximum expressziós szintjüket és ez az a mennyiség, mely csökkenti a rák kialakulásának kockázatát (THOMSON, 2004). Egy szelénben gazdag étrend 30-50 %-kal csökkentheti a daganatos megbetegedések előfordulását (CLARK és mtsai, 1996).

Kísérleti körülmények között megállapították, milyen tünetek jelentkeznek szelén mérgezés következtében a madaraknál: az állatok takarmányfelvétele csökken, ezáltal testtömegük is csökken, a máj és a vese szelén koncentrációja nő, az elhullások száma nő, valamint embrionális korban fejlődési zavarok lépnek fel (HEINZ és mtsai, 1996; GREEN és ALBERS, 1997). A túlzott szelén bevitel az antioxidáns rendszerre is káros lehet. Ennek az az oka, hogy bizonyos koncentráció felett a glutation-peroxidázok aktivitása már nem fokozható, sőt csökken (GAÁL, 1998), ezenkívül a sejtekben található redukált glutation mennyisége is csökken, a lipid peroxidációs folyamatok intenzitása viszont nő, mely végső soron nekrotikus szövethárosodást okoz (MÉZES és MATKOVICS, 1986).

### **3. 4. 2. A máj funkciói és fehérje összetétele**

A máj élettani funkciója sokrétű, részt vesz a fehérjék, szénhidrátok és lipidek anyagcseréjében, különböző anyagok raktározásában (pl. zsír, glikogén, vitaminok, vas), szabályozza a szervezet só- és vízháztartását, és mindezek mellett nagyon fontos szerepet tölt be a méregtelenítésben is. A máj képes mind az endogén, mind az exogén vegyületek eliminációjára. A detoxifikálás nagyon komplex biokémiai folyamat, a benne részt vevő enzimek a zsírban oldódó toxinokat vízben oldódó toxinokká alakítják, melyek így már kiválasztódhatnak a szervezetből. A májban lejátszódó méregtelenítés két fő szakaszra osztható. Az első fázisban a citokróm P-450 enzim rendszer vesz részt (oxidációs, redukációs, hidrolizációs folyamatok játszódnak le), mely működése során szabadgyökök képződnek, ezek károsíthatják a sejteket, ezért van szükség az antioxidánsokra. A második fázis a konjugációs szakasz, itt a toxinokhoz olyan molekulák kapcsolódnak (pl.: cisztein, glicin, kén), melyek hatására kevésbé lesznek veszélyesek, valamint vízben oldhatóvá válnak. Ezen a fázison belül többféle útvonalon történhet meg a káros anyagok semlegesítése: szulfatálási, glükuronidációs, glutation konjugációs, acetilációs, aminosav konjugációs és metilációs útvonalakon (ROLAND és mtsai, 1994; MCKINNON és mtsai, 1996).

Fehérje összetételét tekintve a máj nagy változatosságot mutat. Funkciójuk szerint csoportosítva a máj fehérjéit az alábbi fő kategóriákat lehet megemlíteni: aminosav metabolizmusban, lipid metabolizmusban, szénhidrát metabolizmusban, nukleotid metabolizmusban részt vevő fehérjék, a stressz válasz fehérjéi, fehérje foldingért felelős fehérjék, kis molekulák transzportjáért felelős fehérjék, a sejt szerkezet kialakításában szerepet játszó fehérjék, sejt növekedésért felelős fehérjék, energiatermelésben részt vevő fehérjék, citromsav ciklus fehérjéi, valamint egyéb, olyan fehérjék, melyeket a fentebbi csoportokba nem lehet besorolni (TALAMO és mtsai, 2003).

A máj szeléntartalma a szöveti felhasználással arányosan gyorsan változik, és úgy tűnik, hogy a különböző testszövetek szelén igényét a szervezet elsősorban a májból elégíti ki (MARIN-GUZMAN és mtsai, 1997). Mivel a szelén a szövetekben fehérjékkel lép kapcsolatba (BURK és HILL, 1993), ezért a proteomikai vizsgálatok megfelelőek arra, hogy nyomon követhessük a szelén hatására bekövetkező expressziós változásokat.

### **3. 5. Különböző genotípusú növendék kosok hosszú hátizom szövetének proteomikai elemzése**

#### **3. 5. 1. Fajtaösszehasonlító vizsgálatok**

A proteomika vizsgálati módszerei lehetőséget biztosítanak arra, hogy a fehérjék szintjén vizsgáljuk a fajták között fenotípusosan mutatkozó különbségeket. Feltérképezhetjük a hústermelőképességbeli és a húsminőségbeli eltéréseket, valamint az erőteljes szelekció miatt fellépő metabolikus különbségeket. A mai napig nagyon kevés olyan közlemény látott napvilágot, mely gél-alapú proteomikai módszerekkel vizsgálja a fajták között különbségeket gazdasági állatok esetén, illetve ezek a tanulmányok is csak szarvasmarha és sertés fajokra korlátozódnak.

TIMPERIO és munkatársai 2009-ben a holstein fríz és a chianina fajták összehasonlító proteomikai vizsgálatát végezték el. A két fajta jól szemlélteti az extrémén tej ill. hús irányba szelektált fajták közötti különbségeket. A kutatás célja az volt, hogy megállapítsák, az erős szelekciónak volt-e proteom szinten mérhető hatása a máj metabolizmusára. Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézist használtak arra, hogy detektálják a két fajta között mutatkozó expressziós különbséget. 39 olyan fehérjét találtak, melyek eltérő expressziós szintet mutattak a két fajta között. 12 fehérje a chianina fajtában, míg 13 a holstein frízben mutatott magasabb expressziós szintet, 7 olyan fehérjét azonosítottak, mely csak a chianina-ban, és másik 7 olyat, melyek csak a holstein frízben expresszálódtak. A holstein fríz egyedekben a 13 fehérje között több hősokk és chaperon fehérjét is azonosítottak, míg a chianina-ban a metabolikus enzimek expressziója nőtt meg, különösen, amelyek a zsírsav metabolizmusban vesznek részt.

Sertések esetén XU és munkatársai (2009) végezték egy vizsgálatot, mely során meishan (őshonos kínai) és nagy fehér sertés fajták közötti eltéréseket próbálták detektálni a fehérjék szintjén. A két fajta között számos különbség van az izom növekedése és a húsminőség terén, de ezek molekuláris háttere még nem tisztázott. Ebben a tanulmányban a hosszú hátizom szövet összehasonlító proteomikai vizsgálatát végezték el 2D-PAGE módszerrel. 25 eltérő módon expresszálódott fehérjét azonosítottak a két fajta között, melyből 14-et sikerült azonosítani

tömegspektrometriával. Ez a 14 fehérje négy csoportba sorolható funkciójukat tekintve: energia metabolizmus fehérjei, védekezésben és stressz válaszban részt vevő fehérjék, miofibrilláris filamentumok és egyéb proteinek.

Egy másik sertéseken végzett kísérlet során szintén két fajtát hasonlítottak össze (KIM és mtsai, 2010). Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgálták a hosszú hátizom mitokondriális fehérjei között mutatkozó különbségeket egy koreai őshonos sertés és a landrace esetén. Fajta specifikus bélyegeket találtak a stressz érzékenység, a növekedési tulajdonságok és a húsminőség kapcsán.

HOLLUNG és munkatársai (2008) norvég sertés fajtákat (landrace és duroc) hasonlítottak össze az adductor izom fehérje összetétele alapján. 50 fehérje expressziójában találtak különbséget a két fajta között. Ez a vizsgálat demonstrálta a metabolizmusban és hús összetételben lévő különbségeket a két fajta között. A landrace fajtában a magasabb glikolitikus aktivitáshoz köthető fehérjék, míg a durocban a struktúrfehérjék, a sejtes védekezésben és stresszválaszban résztvevő fehérjék expressziója nőtt meg.

A fenti vizsgálatok eredményeit összehasonlítva látható, hogy izomszövetek esetén a fajták közötti különbségek, proteom szinten leginkább a meatbolikus enzimek, a stresszfehérjék és a struktúrfehérjék expressziójához köthető.

### **3. 5. 2. A cigája**

A cigája fajta Kis-Ázsiából származik, Magyarországra a 1700-as években került Románián és a Balkánon keresztül és kitűnően alkalmazkodott a magyarországi földrajzi és klimatikus viszonyokhoz (GÁSPÁRDY, 2000). Elterjedését segítette, hogy a legtöbb juhajtával ellentétben nem kettős, hanem hármás hasznosítású fajta; gyapja és húsa mellett a teje is értékesíthető (KOMJÁTHY, 1996). Hazánkban ma a cigája két változatban található meg (KUSZA és mtsai, 2010). Mindkettő jellemzően suta, ritkán a kosoknak csavarulatos szarva fejlődhet ki. A fej közepes méretű, az anyáké kevésbé, a kosoké jobban domború oldalnézetet mutat. Középmagas termet, illetve hosszú, lelógó fül jellemzi őket. A nyak közepes méretű, a vállak a marral együtt közepesen szélesek és izmoltak. A jó felépítésű állatok törzse hosszú, mély és dongás. A has a kosoknál

hengeres, az anyáknál terjedelmes. A far enyhén lejt és közepesen izmolt, a végtagok viszonylag hosszúak és mérsékelten izmoltak. A tőgy jól fejlett. Gyapja alapvetően fehér, néha sötét szálakkal tarkított, feje és lábai feketék vagy sötétbarnák lehetnek. Ellenálló és élelmes, igénytelen fajta (KUKOVICS és JÁVOR, 2002).

A réghonosult cigája teje és húsa is fogyasztható, gyapjúja textilipari nyersanyag (*1. kép*). A nemesített vagy tejelő cigája kimondottan tejtermelésre szelektált fajta, tejtermelő képessége jó, választás után 5-6 hónapig fejhető, ezalatt 110-120 liter tejet ad. A jobb képességű egyedek termelése ezen mennyiség duplája is lehet (KUKOVICS és mtsai, 2003). Magyarországon a fajta nem számít veszélyeztetettnek, kis állományban állandóan jelen van a gazdaságokban (TŐZSÉR és BEDŐ, 2003).



**1. kép: A cigája fajta**  
(Forrás: Oláh János)

### **3. 5. 3. A szapora merinó**

Magyarországon a merinó juhok tenyésztése az 1770-es években kezdődött, mikor Mária Terézia 30 juhot hozatott Spanyolországból. A XIX. század közepére állományuk létszáma már 10000 egyed körül volt. Hazánkban a juhállomány több mint 90%-a és a törzskönyvezett állatok számának körülbelül 60%-a merinó. A merinó vegyes (kettős vagy hármás) hasznosítású fajta. A fajta tenyésztése, törzskönyvezése két típusban (fésűsmerinó illetve húsmerinó) zajlott. Jelenleg és valószínűleg a jövőben is a fő hasznosítási formának a hústermelést kell tekinteni.

A booroola merinóban azonosították egy olyan gént (FecB), melynek mutációja homozigóta és heterozigóta formában is nagyobb született bárányszámmal párosul. A booroola merinót a világon több országban is felhasználták keresztezési programokban a szaporaság növelésének érdekében. 1982-ben a magyar merinó anyaállomány és az Új-Zélandról származó booroola merinó kosok keresztezéséből egy új fajta, a szapora merinó (2. kép) kialakítása kezdődött meg, ezek az állatok tömegesebbek a booroola merinónál, de lényegesen kisebb a szaporaságuk (VERESS, 2000). A szapora merinó fajta esetében a génmegőrző és nemesítő munka célja olyan szapora merinó anyajuh és kos állomány fenntartása, melyek homozigóták a FecB génre nézve (NOVOTNINÉ és ÁRNYASI, 2005) .

A fajta jellemzése során elmondható, hogy a fej arci része és a lábvégek benőttsége nem jellemző, az arci rész megnyúltabb, miként a csontozata is finomabb. Az anyák suták, de gyakori a csökevényes és sarlós szarvalakulás is. A kosok csigás szarvúak, ritkábban csökevényes szarvúak, a sutaság igen ritka. A mellkas mély, a hát gyakran rövid, előremélyedt. Az arci részen és a lábvégeken gyakoriak a pigmentfoltok, a körmökön is előfordulhat a pigmentáltság. A tőgy fejlett, mirigyes tapintású, a tőgybimbók közepes méretűek, szabályos illesztésűek. A bunda zárt, hosszú fűrtű, finom, kiegyenlített (TŐZSÉR, 2003).



**2. kép: A szapora merinó fajta**

(Forrás: Oláh János)

### 3. 5. 4. A vázizom fehérje összetétele

A húsok összetételét tekintve 56-72%-uk víz, 15-22%-uk fehérje, 5-34%-uk intramuszkuláris zsír, 3,5%-uk szénhidrátok, sók, ásványi anyagok és vitaminok. Az összetevők arányát több tényező befolyásolja, a faj, fajta, nem, életkor és az állatok tartási körülményei is.

Az izomban található fehérjék három nagyobb csoportba sorolhatók: miofibrilláris fehérjék, szarkoplazma fehérjék és kötőszöveti fehérjék. A miofibrilláris fehérjék a magasabb só koncentrációjú oldatokban oldhatóak, ide tartoznak az aktin (a teljes fehérjetartalom 15-30%-a), a miozin (a teljes fehérjetartalom 50-60%-a), a tropomiozin, a troponin, a titin és az alfa-, béta-aktinin, melyeknek elsősorban az izommozgásban van szerepük. Ezek a fehérjék alkotják a vékony (aktin) és vastag (miozin) filamentumokat, melyek ismétlődő egységei a szarkomerek. A szarkoplazma fehérjék vízben és gyengébb sóoldatokban oldhatóak, ide tartoznak az albuminok, mioglobinn, globuláris fehérjék, miogén, mitokondriális fehérjék, a lizoszómák, a liposzómák és a szarkoplazmás retikulum hálózat fehérjéi. A kötőszöveti fehérjék vízben és sóoldatokban oldhatatlan frakciót képeznek, ilyenek a kollagén (a fehérjetartalom 20-25%-a), az elasztin és a retikulin (BOULEY és mtsai, 2004; OHLENDIECK, 2011).

### **3. 6. Különböző élősúlyban levágott charolais bikák vázizom szövetének proteomikai vizsgálata**

#### **3. 6. 1. A charolais fajta**

A charolais fajtát nagy fejlődési erély, jó gyarapodási készség és nagytömegű izomzat jellemzi, mindezek miatt válhatott az egyik vezető húsmarha fajtává (3. kép). A fajta Franciországból alakult ki a 18. században. Eredetileg hármashasznosítású volt, de a 20. század elejétől kezdve fokozatosan húshasznú marhává vált. Magyarországon a charolais fajtatisztán és különböző keresztezési konstrukciókban kerül tenyésztésre.

Az állatok kültakarója általában teljesen fehér vagy krémszínű, nagyon ritkán alig észrevehető foltokkal. A fej viszonylag kicsi, rövid és széles, szarvai fehérek, kerek, előre íveltek, de szarvatlan változata is ismert. A mellkas mély, a váll és lapocka kerek, a hát nagyon izmolt, a vesetájék széles és vastag. A csípők és a far egyaránt nagyon széles, a combok kerek, a lábak viszonylag rövidek, szabályosak. A kifejlett tehének átlagos súlya 650-750 kg között változik, míg a bikáké 1000-1200 kg közötti. A többi fajtához képest előnyként lehet megemlíteni, hogy akár 750 kg-os végsúlyig is gazdaságosan hizlalható. Húskitermelési százaléka és értékes húsrészeinek aránya kedvező, jól márványozott a húsa (FELIUS, 1985; BODÓ és mtsai, 2003).



**3. kép: A charolais fajta**

(Forrás: Magyar charolais tenyésztők egyesülete)

### **3. 6. 2. A vágáskori élősúly és a hús minőségi és mennyiségi tulajdonságainak kapcsolata**

Az ideális vágáskori életkor és súly régóta vitatott téma a húzóállatok vizsgálata során (ALBERTÍ és mtsai, 2008). Más-más igényekkel lép fel a tenyésztő, a feldolgozóipar és a fogyasztó is. A vágáskori élősúly nagymértékben függ a fajtától és a vásárlók igényétől, befolyásolja a vágott test minőségét, valamint a húsminőséget is (SANUDO és mtsai, 2003). A szarvasmarhák növekedési rátája pozitív korrelációban áll a kifejlett kori testsúllyal. Az erőteljesebb súlygyarapodású állatok több rostot termelnek az izmaikban, mely nagyobb glikolitikus aktivitással párosul. A glikolitikus aktivitás mértéke összefüggésbe hozható a porhanyóssággal is, mely a vásárlók számára az egyik legfontosabb húsminőségi tulajdonság (JURIE és mtsai, 1995). Húsmarhák esetén az életkor előrehaladtával a nehezen oldódó kollagén keresztkötések száma megnő, ami végső soron ahhoz vezet, hogy az idősebb állatok húsa kevésbé lesz porhanyós (TUMA és mtsai, 1962; SHORTHOSE és HARRIS, 1990; WESTON és mtsai, 2002), valamint az intramuszkuláris zsírtartalom is megnő a kor előrehaladtával (MALTIN és mtsai, 1998; BRUNS és mtsai, 2004).

Mindeddig kevés olyan tanulmány látott napvilágot, mely gazdasági állatok esetén vizsgálja az életkor előrehaladtával bekövetkező változásokat fehérje expressziós szinten. Több patkány, egér és humán kísérlet foglalkozik a szöveteken lejátszódó időskori változásokkal, melyekkel bizonyos betegségeket is összefüggésbe tudnak hozni. Gazdasági állatok esetén azonban nem az időskori fehérje expressziós szint változásokkal kell számolni, melyek az öregedés folyamán kialakulnak, hanem azokkal a változásokkal, melyek a hizlalási időszak alatt detektálhatók.

Koreai kutatók sertések esetén vizsgálták a karaj fehérje összetételét 30, 70, 130, 170 és 300 napos állatoknál. Az alkalmazott kétdimenziós gélelektroforézis módszer segítségével megállapították, hogy öt fehérje expressziójában szignifikáns változás volt megfigyelhető. Az öt fehérjéből négyet sikerült azonosítani tömegspektrometria segítségével. Két izomrost fehérje (myosin light chain 1 slow-twitch egyik izoformája és a troponin T) mutatott szignifikánsan magasabb expressziós szintet a korai postnatális fejlődési fázisban, majd jelentősen lecsökkent a mennyiségük a növekedési időszak folyamán. Ezek a fehérjék az izomösszehúzásban játszanak szerepet. A

másik két azonosított fehérje a triosephosphate isomerase (TPI) és a DJ-1 fehérje volt, a TPI a glikolízis egyik katalizáló fehérjéje, míg a DJ-1 egy antioxidáns. Ezek expressziója lineárisan növekedett a vizsgált időintervallumban (KIM és mtsai, 2007).

Szintén sertéseknél hasonlították össze a 6, 9 és 12 hónapos korban levágott állatok adductor izmából vett minták fehérje összetételét. 21 olyan fehérjét találtak, melyeket összefüggésbe tudtak hozni az életkorral. Ezeket a fehérjéket három fő csoportba tudták besorolni: struktúrfehérjék, metabolikus fehérjék és a sejtes védekezésben szerepet játszó ill. stressz fehérjék. A struktúrfehérjék mindegyike a fiatalabb állatokban mutatott magasabb expressziós szintet, míg a metabolikus fehérjék és a stresszhez kapcsolódó fehérjék nagy többsége az idősebb állatokban (HOLLUNG és mtsai, 2009).

Egy másik kutatócsoport (DOHERTY és mtsai, 2004) broiler csirkék mellizom szövetének proteomikai vizsgálatát végezte el, mely során a kikelést követő 1. naptól a 27. napig monitorozták az izomfehérjék dinamikus változását. Az egyes gélképeken szemmel is látható volt az a nagy mértékű változás, mely a broiler csirkék vázizom szövetében végbemegy a gyors növekedés során. Ennél a vizsgálatnál is megállapítható, hogy a metabolikus enzim fehérjék a fiatalabb állatok mintáiban alacsonyabb mennyiségben vannak jelen, és majd csak a 9. naptól kezdve nőtt meg az expressziójuk.

Szintén csirkéknél (thai őshonos csirkék, lassú növekedési rátával jellemezhető), szintén a mellizom proteomikai vizsgálatát végezték el TELTATHUM és MEKCHAY (2009), de ebben az esetben 0, 3, 6 és 18 hetes állatok mintáit hasonlították össze. Megállapították, hogy az állatok életkorának előrehaladtával egyre csökken a kétdimenziós gélképeken látható fehérje spotok száma. Öt olyan fehérjét sikerült azonosítaniuk, melyek változása szignifikánsan kapcsolódik az állatok életkorához. Ezek a következők voltak: foszfoglicerát mutáz 1, apolipoprotein A1, triózfoszfát izomeráz 1, 25 kDa-os hősokk fehérje és a zsírsav kötő fehérje 3. Ezek közül a foszfoglicerát mutáz 1 és a triózfoszfát izomeráz 1 fehérjék pozitív korrelációt mutattak az életkorral, míg az apolipoprotein A1 és a zsírsav kötő fehérje 3 fehérjék negatív korrelációt. A HSP25 kis hősokk fehérje fluktuációt mutatott a növekedés során. Ezek az eredmények is bizonyítják, hogy az energia metabolizmus fehérjéi milyen fontos szerepet játszanak az izom fejlődés során.

A proteomika a hústermeléssel, az izomszövettel kapcsolatos kutatásokban még egészen új terület. Habár az elmúlt években számos közlemény látott napvilágot, melyek próbálnak fényt deríteni a húsminőség különböző aspektusaira, az öregedési folyamatokon keresztül a környezet változásaira adott válaszokon át. Azok a kutatások melyek a klasszikus modell organizmusok (pl. egér) vagy akár az ember izom növekedésével és fejlődésével foglalkoznak, értékes információval szolgálhatnak a haszonállatok húskutatásának szempontjából (HOLLUNG és mtsai, 2007). Az állati modellek, melyek jól jellemzett növekedési fenotípusokkal és egyedi húsminőségi tulajdonságokkal rendelkeznek, sokban hozzájárulnak, hogy megértsük az izom növekedés és a húsminőség kapcsolatát, azáltal hogy betekintést nyerhetünk a folyamatok molekuláris mechanizmusába. Ez mind a húsüzemek mind a vásárlók számára hasznos lenne a húsminőség szempontjából (BENDIXEN, 2005).

## **4. ANYAG ÉS MÓDSZER**

### **4. 1. Házityúk máj proteomjának változása szelén indukció hatására**

#### **4. 1. 1. Állatok és kezelés**

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 takarmányozás 7 héten át, a teljes takarmányozási időszakban, tartott. A szelén kiegészítés LactoMicroSel adalék hozzáadásával történt, mely baktériumokban termeltetett elemi szelént tartalmaz. A kísérleti csoport takarmánykeverékében lévő szelén mennyisége, többszöröse az Európai Unióban megengedett maximum értéknek (0,5 mg/kg, ZOIDIS és mtsai, 2010), erre azért volt szükség, hogy a szelén hatására a fehérjék expressziójában esetlegesen bekövetkező változások kimutathatóságának valószínűségét növeljük. A proteomikai vizsgálatok előtt meghatároztuk a májban lévő szelén koncentrációját. A kontroll állatok májában átlagosan 185 µg/kg, míg a kísérleti csoportban 890 µg/kg volt a szelén koncentrációja. A kezelt csoport egyedein nem tapasztaltuk a szelén mérgezés tüneteit.

#### **4. 1. 2. Mintavétel**

A mintagyűjtés 7 hét takarmányozást követően az állatok vágásakor történt. Közvetlenül az állat kivéreztetése után orvosi szikével 0,5 g máj mintát gyűjtöttünk egyedenként 3 ismétlésben (a 3 ismétlésből az izolálást megelőzően egy közös mintát képeztünk, ezzel csökkentve a mintavételből adódó esetleges eltéréseket a fehérje összetételben), kriocsövekbe tettük a máj darabkákat, a kriocsöveket pedig azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük, a további tárolás -80 °C-on történt. A folyékony nitrogén (-196 °C) megakadályoz minden enzimátikus folyamatot, melyek normál körülmények között végbemennének a szövetben a vágást követően. A proteomikai vizsgálatok során, különösen nagy gondot kell fordítanunk arra, hogy a mintánk a lehető legrövidebb időn belül folyékony nitrogénbe kerüljön, ezzel megakadályozva a fehérje bontó enzimek (proteázok) aktivitását.

A továbbiakban, mind a fehérjék izolálása, mind a kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis esetén, az egyes beállítások teszteléséhez készítettünk egy „pool”-t, mely egyenlő mennyiségben tartalmazta mindkét csoport minden egyedének mintáját, majd folyékony nitrogénnel dörzsmozsárban homogenizáltuk ezt a keveréket. A tesztelésekhez szükséges futtatásokat két ismétlésben végeztük el.

#### 4. 1. 3. Fehérjék izolálása

A -80 °C-on tárolt mintából 500 mg-ot kimértünk, dörzsmozsárban folyékony nitrogénnel porrá törtük. A fehérjék oldatba vitelére két módszert teszteltünk:

1) A homogenizált mintákból 100 mg-ot kimértünk, hozzáadtunk 80 µl-t a 25X-ös proteáz inhibitorból, majd 1 ml lízis puffert, melyből két különböző összetételt is teszteltünk:

- 8 M urea, 2 M thiourea, 2 m/V% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte, a pH 5-8-as stripeknél 4/6 és 6/8-as ampholytot használtunk 1:2 arányban
- 8,5 M urea, 2 M thiourea, 4 m/V% CHAPS, 60mM DTT, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte, a pH 5-8-as stripeknél 4/6 és 6/8-as ampholytot használtunk 1:2 arányban

Egy órát szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintákat, ezt követően 10000 g-n 45 percig centrifugáltuk.

2) A homogenizált mintából 100 mg-ot kimértünk, hozzáadtunk 80 µl-t a 25X-ös protease inhibitor cocktail-ból, majd 1ml lízis puffert (8,5 M urea, 2 M thiourea, 4 m/V% CHAPS, 60 mM DTT, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte, a pH 5-8-as stripeknél 4/6 és 6/8-as ampholytot használtunk 1:2 arányban). Egy órát szobahőmérsékleten inkubáltuk a lízis pufferrel kezelt mintákat, ezt követően 10000 g-n 45 percig centrifugáltuk. A felülúszót 2-D Cleanup Kit segítségével tisztítottuk tovább. A kit megtisztítja a mintát a detergensektől, sóktól, nukleinsavaktól és lipidektől, valamint koncentrálna a fehérjéket.

A tisztított minták koncentrációját RC DC Protein Assay Kit segítségével határoztuk meg, marha szérum albumint (BSA) használva standardként.

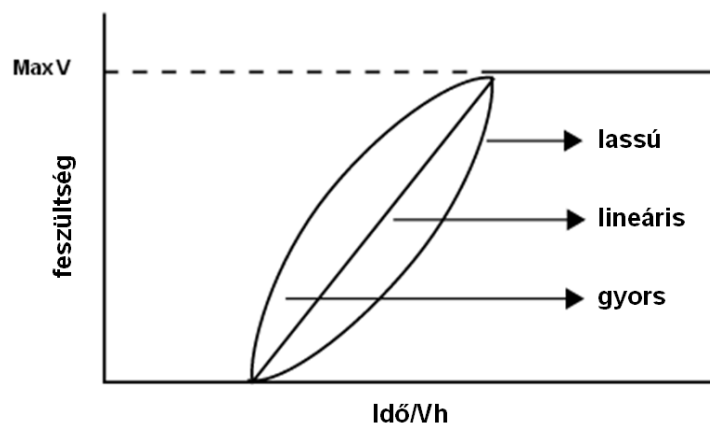
#### 4. 1. 4. Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D-PAGE)

Az első dimenzióban a fehérjéket izoelektromos pontjuk alapján választottuk el Protean IEF Cell (Bio-Rad) izoelektromos fókuszáló berendezés segítségével. A mintákból 20, 50, 100, 150 ill. 300 µg-ot vittünk fel a 7 cm-es pH 3-10-es és pH 5-8-as IPG stripekre (Bio-Rad). Az izoelektromos fókuszálást megelőzően a stripeket passzívan rehidratáltuk a mintákat is tartalmazó rehidratáló oldatban. Két különböző rehidratáló puffert teszteltünk:

- normál rehidratáló oldat: 8 M urea, 2 M thiourea, 2 m/V% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte, 0,002 m/V% brómfenolkék, a pH 5-8-as stripeknél 4/6 és 6/8-as ampholytot használtunk 1:2 arányban
- DeStreak rehidratáló oldat: 8 M urea, 2 M thiourea, 2 m/V% CHAPS, 15 mg/ml DeStreak reagens, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte, 0,002 m/V% brómfenolkék, a pH 5-8-as stripeknél 4/6 és 6/8-as ampholytot használtunk 1:2 arányban

A izoelektromos fókuszálás során kétféle fókuszálási kondíciót teszteltünk (4.ábra):

- Egy lépésben: 4000 V- 20000 Vh (gyors feszültség emelkedés) (gyártói ajánlás)
- Több lépésben: 1. lépés -250 V 15 perc (lineáris feszültség emelkedés)  
2. lépés -4000 V 2,5 óra (lineáris feszültség emelkedés)  
3. lépés -4000 V 20000 Vh (gyors feszültség emelkedés )



4. ábra: Az izoelektromos fókuszálás során alkalmazott feszültség növelés típusai

(Forrás: INTERNET 1)

A fókuszált stripeket a második dimenziós elválasztás előtt ekvilibráltuk. Az IPG stripeket 10 percig inkubáltuk az ekvibráló I. oldatban (6 M urea, 2 m/V% SDS, 0,05 M Tris/HCl pH 8,8, 20 V/V% glycerol, 2 m/V% DTT), majd 10 percig az ekvibráló II. oldatban (6 M urea, 2 m/V% SDS, 0,05 M Tris/HCl pH 8,8, 20 V/V% glycerol, 2,5 V/V% iodoacetamide).

Az ekvibrálást követően a fehérjék második dimenzióban történő elválasztása OmniPAGE Mini (Clever Scientific) vertikális elektroforézis rendszerben SDS tartalmú poliakrilamid gélben (10X10 cm) történt. Az IPG stripek poliakrilamid gélhez történő illesztését 0,5 m/V% agaróz géllal végeztük, melyet brómfenolkékkel festettünk. Különböző sűrűségű géleket teszteltünk (10%, 13%, 15%) (%T). A futtatáshoz 1X-es Tris – Glycin – SDS puffert használtunk. Az első 10 percben 70 V-on futtatuk a géleket, majd ezt követően 180 V-ra emeltük a feszültséget, mindaddig végezve az elektroforézist, míg a brómfenolkék jelző festék el nem érte a gél alját.

Az SDS poliakrilamid gél összetétele (10%, 13%, 15%):

dH <sub>2</sub> O	4/3,4/3 ml
40 m/V% akrilamid/ biszakrilamid (37,5:1)	2/2,6/3 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,00 ml
<u>10 m/V% SDS</u>	<u>80 ul</u>
10 m/V% ammónium perszulfát	75 ul
TEMED	7,5 ul

A második dimenziót követően a fehérje spotok láthatóvá tételére kétféle festési eljárást teszteltünk. Az egyik egy Colloidal Coomassie G-250 alapú festési eljárás (DYBALLA és METZGER, 2009), mely érzékenysége megközelíti az ezüst festését, a másik pedig egy ultraérzékenyséű ezüstoffestés (Pierce Silver Stain Kit).

A Coomassie alapú festést megelőzően a géleket háromszor mostuk Milli-Q vízzel, majd áthelyeztük a Coomassie festékoldatba, melynek összetétele: 0,02 m/V% CBB G-250, 5 m/V% alumínium szulfát-(14-18)-hidrát, 10 V/V% etanol (96%), 2 V/V% ortofoszforsav (85%). Egy éjszakán át inkubáltuk ebben az oldatban, majd ismét vizes mosás következett. Végül az ún. „destaining” oldat segítségével eltávolítottuk a felesleges festéket. A destaining oldat összetétele: 10 V/V% etanol (96%) és 2 V/V%

ortofoszforsav (85%). A gélek további tárolása Milli-Q vízben +4 °C-on történt. Az ezüstoffestést a gyártó instrukciói alapján végeztük (Thermo Scientific, Pierce Silver Stain Kit, INTERNET 3).

Az 1. táblázat összefoglalja 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.

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

<b>Fehérjék izolálása (lízis pufferek)</b>	- 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
<b>Alkalmazott pH tartomány</b>	pH 5-8 és pH 3-10
<b>Fehérjemennyiség</b>	20, 50, 100, 150, 300 µg
<b>Rehidratáló puffer összetétele</b>	- 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
<b>Izoelektromos fókuszálás kondíciói</b>	Egy lépésben: 40000 V- 20000 Vh Több lépésben: 1. lépés -250 V 15 perc 2. lépés -4000 V 2,5 óra 3. lépés -4000 V 20000Vh
<b>SDS poliakrilamid gél koncentrációja</b>	10%, 13%, 15%
<b>Festés módja</b>	Coomassie G-250 és ezüst festés

Kiválasztottuk azokat a beállításokat, mind a mintatisztítás, mind a kétdimenziós gélelektroforézis esetén, melyek segítségével a legtöbb egyedi fehérje foltot tudtuk elkülöníteni a csirkemáj minták poliakrilamid gélképein. Ezekkel az optimális beállításokkal elvégeztük a két csoport (kontroll és szelénnel kezelt) mintáinak kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézisét, egyedenként három ismétlésben.

#### 4. 1. 5. Gélképek analízise

A gélképek szoftveres elemzését a Delta2D (Decodon™ GmbH, Germany) program segítségével végeztük. Ehhez először a két csoport gélképeit feltöltöttük a programba, majd kiválasztottuk, hogy milyen stratégia szerint illessze egymásra azokat. Ebben az esetben azt a stratégiát választottuk, mely során egy csoporton belül az első gélképhez hasonlítja a többit, majd a csoportok első gélképeit egymáshoz (5. ábra).



5. ábra: A csirkemáj minták gélelemzése során használt illesztési stratégia

(Forrás: Delta2D)

Ezután a program egymáshoz illesztette a gélképeket, erre azért volt szükség, hogy a különböző futtatásokból adódó esetleges elcsúszások az elemzést ne befolyásolják (az illesztés manuálisan pontosítható). A következő lépésben egy fúziós gélét hozott létre a szoftver, amelyen az összes fehérjefolt megtalálható. A program minden olyan

intenzitásváltozást megjelöl, melyet fehérjeként értelmez, ezeket utólag manuálisan pontosíthatjuk. A szoftver a fehérjefoltok intenzitását százalékos (V%) adatként határozza meg. A V% egy fehérjefoltra vonatkoztatva azt adja meg, hogy a detektált intenzitás hány %-a az összes detektált fehérjefolt intenzitásának. A szoftver figyelembe veszi a pixelek számát és azok szürke (fehér – fekete) skálán kifejezhető intenzitását. Az abszolút értékkel szemben, a fehérjefolt intenzitás % esetében a felvitt fehérjemennyiségek közötti eltérésekből adódó hiba nem torzítja az eredményt. A detektált foltokat ezután transzferáltuk az összes gélképre, ezáltal lehetségessé vált az eredmények összehasonlítása. Az eredmények statisztikai analíziséhez a kétmintás T-próbát választottuk, a szignifikancia szintet  $p < 0,05$  értékre állítottuk be.

#### **4. 1. 6. Fehérjék azonosítása**

A gélelemző szoftver által detektált, expressziós különbséget mutató fehérje spotokat kivágtuk a gélekből. A fehérjék emésztésére SZABÓ és munkatársai (2012) által leírt protokollt használtuk. A kivágott spotokat egy szike segítségével apró darabokra vágtuk, a festék kivonására 25 mM ammónium-bikarbonát oldatot használtunk, mely 50 V/V% acetonitrilt is tartalmazott, a dehidratálást szintén acetonitrillel végeztük, majd kiszárítottuk a gél darabokat. Ezt követően 12,5 ng/μl tripszinnel, melyet 25 mM ammónium-bikarbonát oldatban vettünk fel, rehidratáltuk a darabkákat és 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk azokat. A peptidek kivonása 5 V/V%-os hangyasav oldattal történt, majd kétszeri mosás következett 60 V/V%-os acetonitrillel, mely 1 V/V% hangyasavat is tartalmazott. Az LC/MS analízis előtt a mintákat vákuum centrifuga segítségével koncentráltuk.

Az emésztett fehérje minták analízisét Waters NanoAcquity UPLC rendszerrel végeztük, melyhez egy Micromass Q-TOF Premier tömegspektrométert kapcsoltunk. A kapott adatok feldolgozására a WATERS Proteinlynx GlobalServer 2.4 szoftvert használtuk, az alapértelmezett beállításokkal. A Swissprot adatbázisban (Swissprot 2012\_05 database (2012.05.10 release, 535,698 entries) történő kereséshez Mascot 2.2-t (Matrix Science, London, UK) használtunk. Scaffold szoftver (version Scaffold 3.62, Proteome Software Inc., Portland, OR) alkalmazásával végeztük el az MS/MS alapú peptid és fehérje analízis validálását. Azokat a fehérjéket fogadtuk el pozitív találatként, amelyeket legalább két, min. 95% konfidenciával azonosított peptid szekvenciával tudtunk alátámasztani.

## **4. 2. Különböző genotípusú növendék kosok hosszú hátizom szövetének proteomikai elemzése**

### **4. 2. 1. Állatok és kezelés**

Az összehasonlító vizsgálatot csókai cigája és szapora merinó fajtákkal végeztük. A kísérletbe 10 növendék kost vontunk be, ebből 4 egyed merinó és 6 egyed cigája volt, a cigája állomány egy időszakban szelekciós nyomásnak volt kitéve a tejtermelési mutatók javítása érdekében. A proteomikai elemzéshez a *musculus longissimus dorsi*-t választottuk.

A kosok azonos korúak voltak, a kismacsi Állattenyésztési Kísérleti Telepről származtak, hizlalásuk *ad libitum* takarmányozással történt. Az állatok hizlalását egy istállóban, kiscsoportos, mélyalmos tartástechnológiában végeztük. Az állatokat átlagosan 4,5 hónapos korban, 40 kg-os élősúlynál vágták le.

### **4. 2. 2. Mintavétel**

A mintavétel a juhok vágóhídi vágásakor történt, kivéreztetés után 20 percen belül, orvosi szikével a *longissimus dorsi* izom 12. és 13. borda közé eső területéről. A minta az izom felszíne alatt 1 cm-es mélységből származott. Kriocsövekbe 2 g izomszövetet gyűjtöttünk egyedenként 3 ismétlésben (a 3 ismétlésből az izolálást megelőzően egy közös mintát képeztünk, így csökkentve a mintavételből adódó esetleges eltéréseket a fehérje összetételben), melyeket azonnal folyékony nitrogénbe helyeztünk, a további tárolás -80 °C-on történt.

A továbbiakban, mind a fehérjék izolálása, mind a kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis esetén, az egyes beállítások teszteléséhez készítettünk egy „pool”-t, mely egyenlő mennyiségben tartalmazta mindkét csoport minden egyedének mintáját, majd folyékony nitrogénnel dörzsmozsárban homogenizáltuk ezt a keveréket. A tesztelésekhez szükséges futtatásokat két ismétlésben végeztük el.

#### 4. 2. 3. Fehérjék izolálása

A -80 °C-on tárolt mintából 500 mg-ot kimértünk, dörzsmozsárban folyékony nitrogénnel porrá törtük. A fehérjék oldatba vitelére két különböző lízis puffert teszteltünk:

- 8 M urea, 2 M thiourea, 2 m/V% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte, a pH 5-8-as stripeknél 4/6 és 6/8-as ampholytot használtunk 1:2 arányban (lízis puffer 1)
- 8,5 M urea, 2 M thiourea, 2 m/V% CHAPS, 65 mM DTT, 40 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte, a pH 5-8-as stripeknél 4/6 és 6/8-as ampholytot használtunk 1:2 arányban (lízis puffer 2)

A homogenizált mintából kétszer 50 mg-ot kimértünk, majd mindkettőhöz hozzáadtunk 56 µl 25X-ös proteáz inhibitor. Ezután 700 µl lízis puffer 1- et adtunk az egyik, illetve ugyanannyi lízis puffer 2-t adtunk a másik homogenizátumhoz. A csövek tartalmát 10 percig Cell Distruptor készülékkel lizáltuk. A lizálást követően a mintákat 40 percig jégen inkubáltuk, utána 10000 g-n centrifugáltuk 45 percig. A felülúszó közvetlenül használható a további vizsgálatokhoz.

A fehérje oldatok koncentrációját RC/DC Protein Assay Kit segítségével határoztuk meg, marha szérum albumint (BSA) használva standardként. A fehérje koncentrátumokat további felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

#### 4. 2. 4. Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D-PAGE)

A mintákból 200 µg-ot vittünk fel a 17 cm-es pH 3-10-es és pH 5-8-as lineáris IPG stripekre (Bio-Rad). A stripeket fókuszálás előtt a mintát is tartalmazó rehidratáló oldatban rehidratáltuk, szobahőmérsékleten 16 órán át.

Két különböző rehidratáló puffert teszteltünk:

- normál rehidratáló oldat: 8 M urea, 2 M thiourea, 2 m/V% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte, a pH 5-8-as stripeknél 4/6 és 6/8-as ampholytot használtunk 1:2 arányban, 0,002 m/V% brómfenolkék

- DeStreak rehidratáló oldat: 8 M urea, 2 M thiourea, 2 m/V% CHAPS, 15 mg/ml DeStreak reagens, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte a pH 5-8-as stripeknél 4/6 és 6/8-as ampholytot használtunk 1:2 arányban, 0,002 m/V% brómfenolkék

Az izoelektromos fókuszálás (Protean IEF Cell, Bio-Rad) kondíciói:

Egy lépésben: 10000 V, 50000 Vh (gyors feszültség emelkedés) (gyártói ajánlás)

Több lépésben: 1. lépés -250 V 20 perc (lassú feszültség emelkedés)

2. lépés -10000 V 2,5 óra (lassú feszültség emelkedés)

3. lépés -10000 V 50000 Vh (gyors feszültség emelkedés)

A fókuszálás 20 °C-on történt, az áramerősséget 50 µA/gél értékre állítottuk.

A fókuszált stripeket az SDS-PAGE előtt ekvilibráltuk. 10 percig inkubáltuk az ekvilibráló I. oldatban (6 M urea, 2 m/V% SDS, 0,05 M Tris/HCl pH 8,8, 20 V/V% glycerol, 2 m/V% DTT), majd 10 percig az ekvilibráló II. oldatban (6 M urea, 2 m/V% SDS, 0,05 M Tris/HCl pH 8,8, 20 V/V% glycerol, 2,5 m/V% iodoacetamide).

Az ekvilibrálist követően a fehérjék második dimenzióban történő elválasztása Protean II XL vertikális elektroforézis rendszerben (Bio-Rad) történt. Ennek során 16X20 cm-es, 13%-os (%T) poliakrilamid tartalmú géleken végeztük a molekulatömeg szerinti elválasztást. Az első 30 percben alacsony áramerősség (16 mA/gél) mellett futtattuk a géleket, majd ezt követően 24 mA/gélre emeltük az áramerősséget, mindaddig végezve az elektroforézist, míg a brómfenolkék jelző festék el nem érte a gél alját. Egy hűtő rendszer segítségével konstans 20 °C-os hőmérsékletet biztosítottunk a futtatás idejére. A futtatáshoz 1X-es Tris – Glycin – SDS puffert használtunk.

Az SDS poliakrilamid gél összetétele (13%):

dH <sub>2</sub> O	24,90 ml
40% akrilamid/bisakrilamid (37,5:1)	19,50 ml
1,5 M Tris pH 8,8	15,00 ml
<u>10 m/V% SDS</u>	<u>600 µl</u>
10 m/V% ammónium perszulfát	450 µl
TEMED	30 µl

A második dimenziót követően a fehérje spotok láthatóvá tételére tömegspektrometriával kompatibilis ezüsfestést alkalmaztunk (SHEVCHENKO és mtsai, 1996), mely a 2. táblázatban megadott lépésekből állt.

**2. táblázat: A juh hosszú hátizom proteomikai vizsgálata során alkalmazott ezüsfestés lépései**

Lépések	Vegyszerek	Inkubálási idő
<b>1. fixálás</b>	50 V/V% metanol, 50 V/V% ecetsav	2 óra
<b>2. mosás</b>	50 V/V% metanol dH <sub>2</sub> O	20 perc 2X15 perc
<b>3. érzékenyítés</b>	1,27 mM nátrium-tioszulfát	3 perc
<b>4. mosás</b>	dH <sub>2</sub> O	2X1 perc
<b>5. festés</b>	0,15 m/V% ezüst nitrát	30 perc
<b>6. mosás</b>	dH <sub>2</sub> O	2X2 perc
<b>7. előhívás</b>	0,04 V/V% formaldehid 2 m/V% nátrium karbonát	a fehérje spotok megjelenéséig
<b>8. leállítás</b>	5 V/V% ecetsav	5 perc

Az 3. táblázat összefoglalja az optimalizálás során tesztelt beállításokat: a fehérje izolálás, az alkalmazott pH tartomány, a rehidratáló pufferek és az izoelektromos fókuszálás kondíciói esetén.

Kiválasztottuk azokat a beállításokat, mind a mintatisztítás, mind a kétdimenziós gélelektroforézis esetén, melyek segítségével a legtöbb egyedi fehérje foltot tudtuk elkülöníteni a hosszú hátizom minták poliakrilamid gélképein. Ezekkel az optimális beállításokkal elvégeztük a két csoport (merinó és cigája) mintáinak kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézisét, mintánként három ismétlésben.

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

<b>Fehérjék izolálása (lízis pufferek)</b>	- 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
<b>Alkalmazott pH tartomány</b>	pH 5-8 és pH 3-10
<b>Rehidratáló puffer összetétele</b>	- 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
<b>Izoelektromos fókuszálás kondíciói</b>	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 50000Vh

#### 4. 2. 5. Gélképek analízise

A gélképek analízise a 4.1.5. fejezetben leírtakkal megegyezően történt.

#### 4. 2. 6. Fehérjék azonosítása

Az expressziós különbséget mutató fehérje spotokat kivágtuk a gélekből, majd apró darabokra aprítottuk. Az ezüstoffestést el kellett távolítanunk a géldarabkákból. Ehhez frissen készített színtelenítő oldatot használtunk: 10 g/L koncentrációjú vörös vérlúgsó (kálium ferricianid) és 10 g/L koncentrációjú vízmentes nátrium-tioszulfát vizes oldatát 1:1 arányban kevertük, majd a gél darabokra 20-50 µl oldatot pipettáztunk, hogy azokat ellepje és 30 percig rázva kevertettük. Ezt követően leszívtuk a zöld színű oldatot, majd friss színtelenítő oldattal addig folytattuk a rázva kevertetést, amíg a gél darabok teljesen elszíntelenedtek, végül 15 percig MilliQ vízzel rázva kevertük. A mosást

nyolcszor ismételtük. A festéktől így módon megtisztított gél darabokat liofilizálóban teljesen beszárítottuk. A jégen tartott liofilizált gél darabokhoz 20 µl tripszin oldatot adtunk (1 µl tripszin stock (0,5 µg/µl) + 99 µl 50 mM ammónium bikarbonát oldat). A tripszin oldat maradékát mintaként kezeltük. A mintákat ezután jégen rehidráltuk 15–45 percig, majd annyi 50 mM ammónium bikarbonát oldatot mértünk mindegyikre, hogy a gél darabokat ellepje és szobahőmérsékleten 16 órán át inkubáltuk. Az emésztés leállításához 1 µl cc. hangyasav oldatot használtunk. A peptidek extrahálását 5 V/V% acetonitril/0,1 V/V% trifluoecetsav oldattal végeztük, majd az extraktumot liofilizáltuk. A liofilizált mintát jégen tartva 10 µl 1 V/V% hangyasav oldatban vettük fel, alaposan vortexeltük, majd mérésig -20 °C-on tároltuk.

A fehérjék azonosítására Easy nLC (Bruker) nanoHPLC-vel kapcsolt 4000 QTRAP (ABSciex) tömegspektrométert használtunk. Információ-függő adatgyűjtést alkalmaztunk, amelynek során 440-1400 amu tömegtartományban egy felderítő pásztázást követően a két legintenzívebb csúcs töltöttségi fokát meghatároztuk, majd a töltöttségi fokok alapján számolt energiával a csúcsokhoz tartozó peptidek fragmentálása és a termékek analízise, az MS/MS spektrumok felvétele történt. A peptideket egy 300 nl/perc áramlási sebesség mellett 90 perces víz-acetonitril gradiens segítségével választottuk el Zorbax 300SB-C18 oszlopon, miután RP-C18 töményítő oszlopon dúsítottuk és a kísérő puffer komponensektől megszabadultunk.

A fehérjék azonosítása a peptidszekvenciák (MS/MS spektrumok) alapján a teljes SwissProt adatbázisból ProteinPilot 4.0 keresőprogram alkalmazásával, a szoftver által tartalmazott biológia módosítások lista felhasználásával történt. Azokat a fehérjéket fogadtuk el pozitív találatként, amelyeket legalább két, min. 95% konfidenciával azonosított peptid szekvenciával tudtunk alátámasztani.

### **4. 3. Különböző élősúlyban levágott charolais bikák vázizom szövetének proteomikai vizsgálata**

#### **4. 3. 1. Állatok és kezelés**

A vázizom szövet proteomikai vizsgálatának elvégzéséhez 10 charolais bikát vontunk be a kísérletbe. Ezek közül 5 állatot átlagosan 500 kg-os élősúlyban (átlag: 519 kg, szórás: 16,49 kg), 440 napos (átlag: 445 nap, szórás: 15,38 nap) korban, míg 5 állatot átlagosan 700 kg-os élősúlyban (átlag: 710 kg, szórás: 31,58), 540 napos korban (átlag: 538 nap, szórás: 43,61 nap) vágta le. A bikákat kötetlen tartásmódban, félintenzív takarmányozással hizlalták. Semi ad libitum takarmányozásuk során silókukorica szilázst és gyepszénát étvágy szerint fogyasztottak, míg árpaszenázsból a hizlalás kezdetén 2 kg, a hizlalás végén 4 kg volt a napi adag. Az abraktakarmány a hizlalás kezdetén napi 4 kg, a végén napi 6 kg hízómarha takarmánykeverék volt. A vizsgálatba bevont bikák átlagosan 247 naposan kerültek hizlalásba, súlyuk ekkor átlagosan 284 kg volt. A *4. táblázatban* látható, hogy a hizlalás alatti napi súlygyarapodásban a két csoport között nem volt eltérés, ezzel szemben a 700 kg-os csoportba tartozó bikáknál szignifikánsan nagyobb volt a rostélyos keresztmetszet, a meleg féltetek súlya, a vágási kihozatal, a színhús arány, a hús/csont arány és a színhús termelés (g/nap).

#### **4. 3. 2. Mintavétel**

A mintavétel az állatok vágásakor történt, orvosi szike segítségével 2 g-nyi mintát vágunk ki a 12. és 13. borda közötti területről, egyedenként 3 ismétlésben (ezekből az izolálást megelőzően egy közös mintát képeztünk, ezzel csökkentve a mintavételből adódó esetleges eltéréseket a fehérje összetételben). A szövetmintákat a vágást követő 30 percen belül kriocsövekbe helyeztük, majd a csöveket azonnal folyékony nitrogénbe tettük. A szövetmintákat a laboratóriumba érkezést követően -80 °C-on tároltuk a további felhasználásig.

A továbbiakban, mind a fehérjék izolálása, mind a kétdimenziós differenciáló gélelektroforézis esetén, az egyes beállítások teszteléséhez készítettünk egy „pool”-t,

mely egyenlő mennyiségben tartalmazta mindkét csoport minden egyedének mintáját, majd folyékony nitrogénnel dörzsmozsárban homogenizáltuk ezt a keveréket. A tesztelesekhez szükséges futtatásokat két ismétlésben végeztük el.

**4. táblázat: Az 500 és 700 kg-os csoport néhány termelési tulajdonságának átlaga és szórása (SD)**

	500 kg		700 kg		P
	átlag	SD	átlag	SD	
Születési súly, kg	39,0	2,0	40,2	1,1	0,273
Napi súlygyarapodás a hizlalás alatt, kg/nap	1,40	0,20	1,43	0,08	0,763
Rostélyos keresztmetszet, cm <sup>2</sup>	99,5	7,05	126,4	11,55	0,003
Meleg féltestek súlya, kg	293,4	13,9	426,7	23,0	0,000
EUROP izmoltsági pontszám (P- = 1 point; E+ = 15 point)	11	1,22	10,4	0,55	0,359
EUROP faggyúzottsági pontszám (1- = 1 point; 5+ = 15 point)	5,8	2,2	4,2	0,45	0,176
Vágási kihozatal, %	57,72	1,03	60,55	1,75	0,014
Csont arány, %	19,64	0,77	18,12	0,91	0,021
Színhús arány, %	70,71	1,18	72,95	1,28	0,021
Hús/csont arány	3,60	0,19	4,02	0,17	0,006
Hús/faggyú arány	10,32	1,12	10,96	1,70	0,501
Színhús termelés, g/nap	469,44	28,31	558,86	38,42	0,003

(Forrás: HARANGI, 2013)

#### 4. 3. 3. Fehérjék izolálása és jelölésük CyDye fluoreszcens festékekkel

A -80 °C-on tárolt vázizom mintákból elvégeztük a fehérjék kivonását. A fagyott szövetdarabokat egy kerámia mozsárban porrá dörzsöltük, közben folyamatosan folyékony nitrogént adagoltunk hozzá, ezzel megakadályozva a minta kiolvadását. Ebből a porból 50 mg-ot streil eppendorf csövekbe vittünk át, majd 1 ml DIGE kompatibilis lízis puffert mértünk a csövekbe. Három különböző összetételű puffert teszteltünk:

- 7 M urea, 2 M thiourea, 4 m/V% CHAPS, 30 mM Tris (pH 8,5)
- 7 M urea, 2 M thiourea, 4 m/V% CHAPS, 30 mM Tris, 10 mM DTT (pH8,5)
- 8 M urea, 4 m/V% CHAPS, 30 mM Tris (pH 8,5)

Az elegyeket jégen inkubáltuk 60 percig, közben 10 percenként vortexeléssel homogenizáltuk. Ezt követően a mintákat 45 percig centrifugáltuk 10000 g-n, ennek következtében két fázis alakult ki a csőben. Az alsó fázis tartalmazta a sejttörmelékét, míg a felső fázis (felülúszó) az oldatba vitt fehérjéket. A felülúszót leszívtuk mindegyik minta esetén, és további felhasználásig  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A fehérje oldatok koncentrációját RC/DC Protein Assay Kit segítségével határoztuk meg, marha szérum albumint (BSA) használva standardként.

A minták jelölésére CyDye DIGE Fluor Kit-et használtunk. Cy3 festékekkel az 500 kg-os csoportba tartozó állatok mintáit jelöltük, míg a Cy5 festékekkel a 700 kg-os csoportba tartozó egyedek mintáit. A két csoport összes egyedének mintáiból létrehoztunk egy mixet, melyet a Cy2 festékekkel jelöltünk és a későbbiekben a gélek szoftveres elemzése során ezeket a mintákat használtuk belső standard-ként (a tesztelés során, az erre a célra képzett poolt használtuk mindhárom festék esetén). A fehérjék jelölését a gyártó utasításainak megfelelően végeztük,  $50\text{ }\mu\text{g}$  fehérjéhez  $400\text{ pmol}$  CyDye festéket adtunk. A jelölt fehérje oldatot vortexelést követően sötétben, jégen 30 percig inkubáltuk. A jelölési folyamat leállításához  $1\text{ }\mu\text{l}$   $10\text{ mM}$  lizin oldatot használtunk, így megkötve a fel nem használt festéket, majd ismételt vortexelést követően 10 percig sötétben, jégen inkubáltuk a csöveket. Az így előkészített mintákat egy  $8\text{ M}$  urea,  $130\text{ mM}$  DTT,  $4\text{ m/V}\%$  CHAPS,  $2\text{ V/V}\%$   $100\text{X}$  Bio-Lyte 3/10 ampholyte (a pH 5-8-as stripeknél 4/6 és 6/8-as ampholytot használtunk 1:2 arányban) tartalmú pufferben vettük fel.

#### **4. 3. 4. Kétdimenziós differenciáló gélelektroforézis (2D-DIGE)**

Az első dimenzióban a fehérjéket izoelektromos pontjuk alapján választottuk el az izoelektromos fókuszáló berendezés (Protean IEF Cell, Bio-Rad) segítségével. A vizsgálat során  $17\text{ cm}$ -es lineáris IPG stripeket (Bio-Rad) használtunk pH 5–8-as és pH 3-10-es tartományban. Mintánként  $50\text{ }\mu\text{g}$  fehérjét vittünk fel az egyes stripekre, így egy IPG stripben összesen  $150\text{ }\mu\text{g}$  fehérjét tudunk elválasztani, hiszen ezzel a módszerrel lehetőségünk van a két csoport mintáinak és a belső standard mintának egy gélben történő futtatására.

Az izoelektromos fókuszálást megelőzően a stripeket passzívan rehidratáltuk a mintákat is tartalmazó rehidratáló oldatban ( $2\text{ M}$  thiourea,  $7\text{ M}$  urea,  $4\text{ m/V}\%$  CHAPS,

13 mM DTT, 1 V/V% Bio-Lyte 4/6 és 6/8 ampholyte 1:2 arányban, 0.002 m/V% brómfenolkék) 15 órán keresztül, szobahőmérsékleten.

Az izoelektromos fókuszálás során teszteltük az egy ill. több lépésben történő elválasztást. Az izoelektromos fókuszálás (Protean IEF Cell, Bio-Rad) kondíciói:

Egy lépésben: 10000 V - 50000 Vh (gyors feszültség emelkedés) (gyártói ajánlás)

Több lépésben: 1. lépés -250 V 20 perc (lassú feszültség emelkedés)

2. lépés -10000 V 2,5 óra (lassú feszültség emelkedés)

3. lépés -10000 V 50000 Vh (gyors feszültség emelkedés)

Az áramerősséget 50 mA/strip-ben limitáltuk és a fókuszálást 20 °C-on végeztük.

A fókuszált stripeket az SDS-PAGE előtt ekvilibráltuk. 10 percig inkubáltuk az ekvilibráló I. oldatban (6 M urea, 2 m/V% SDS, 0,05 M Tris/HCl pH 8,8, 20 V/V% glycerol, 2 m/V% DTT), majd 10 percig az ekvilibráló II. oldatban (6 M urea, 2 m/V% SDS, 0,05 M Tris/HCl pH 8,8, 20 V/V% glycerol, 2,5 m/V% iodoacetamide).

Az ekvilibrált követően a fehérjék második dimenzióban történő elválasztása Protean II XL vertikális elektroforézis rendszerben (Bio-Rad) történt. Ennek során 16X20 cm-es, 13%-os (%T) poliakrilamid tartalmú géleken végeztük a molekulatömeg szerinti elválasztást. Az első 30 percben alacsony áramerősség (16 mA/gél) mellett futtatuk a géleket, majd ezt követően 24 mA/gélre emeltük az áramerősséget, mindaddig végezve az elektroforézist, míg a brómfenol kék jelző festék el nem érte a gél alját. Egy hűtő rendszer segítségével konstans 20 °C-os hőmérsékletet biztosítottunk a futtatás idejére. A futtatáshoz 1X-es Tris – Glycin – SDS puffert használtunk.

Az SDS poliakrilamid gél összetétele (13%)

dH <sub>2</sub> O	24,90 ml
40% akrilamid/ bisz akrilamid (37,5:1)	19,50 ml
1,5 M Tris pH 8,8	15,00 ml
10 m/V% SDS	600 µl
10 m/V% ammónium perszulfát	450 µl
TEMED	30 µl

A második dimenziós elválasztást követően a Cy2 (belső standard), Cy3 és Cy5 festékekkel jelölt fehérjék láthatóvá tételére Molecular Imager PhorosFX Plus System

(Bio-Rad) készüléket használtunk. Ez a gélszkennelő berendezés lehetővé teszi, hogy az egyes festékeket a saját gerjesztési hullámhosszikon emittáló lézerral szkennelve láthatóvá váljon a fehérje mintázat, így gélenként 3 gélképet kapunk. A fluoreszcens jelölés detektálását követően, a géleket Coomassie Bio-Safe festékekkel is megfestettük, erre azért volt szükség, hogy a spotok szabad szemmel is láthatóvá váljanak. Ennek során a géleket először 5 percig mostuk vízzel, ezt követően kerültek a festékoldatba, melyben 12-14 órán keresztül inkubálódtak. Végül a géleket legalább kétszer 30 percig nagy tisztaságú vízzel mostuk.

Az 5. táblázat összefoglalja az optimalizálás során tesztelt beállításokat: a fehérje izolálás, az alkalmazott pH tartomány és az izoelektromos fókuszálás kondíciói esetén.

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

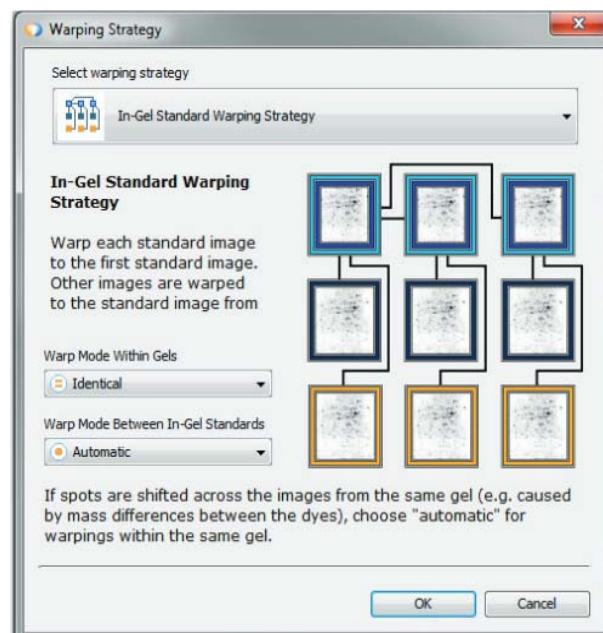
<b>Fehérjék izolálása (lízis pufferek)</b>	- 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris - 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris, 10 mM DTT - 8 M urea, 4% CHAPS, 30 mM Tris
<b>Alkalmazott pH tartomány</b>	pH 5-8 és pH 3-10
<b>Izoelektromos fókuszálás kondíciói</b>	-Egy lépésben: 10000 V- 50000 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 beállításokat, mind a mintatisztítás, mind a differenciáló gélelektroforézis esetén, melyek segítségével a legtöbb egyedi fehérje foltot tudtuk elkülöníteni a hosszú hátizom minták poliakrilamid gélképein. Ezekkel az optimális beállításokkal elvégeztük a két csoport (500 és 700 kg) mintáinak kétdimenziós differenciáló gélelektroforézisét, mintánként három ismétlésben.

#### 4. 3. 5. Gélképek analízise

A gélképek szoftveres elemzését a Delta2D (Decodon™ GmbH, Germany) program segítségével végeztük. Ehhez először a gélképeket csoportonként (500 kg-os csoport, 700 kg-os csoport és a belső standardek csoportja) feltöltöttük a programba, majd kiválasztottuk, hogy milyen stratégia szerint illessze egymásra azokat. A DIGE módszer

használatára esetén mindig azt az opciót kell választanunk, mely lehetővé teszi a belső standardok használatát. Ebben az esetben, az ugyanabban a gélben futtatott egyedekek gélképeit illeszti a velük együtt futtatott belső standard gélképére, majd a standardokat az általunk kiválasztott első standard gélhez illeszti (az illesztés manuálisan pontosítható) (6. ábra). Erre az illesztésre azért van szükség, hogy a gélképek között fellépő, a kétdimenziós futtatásból adódó esetleges különbségeket csökkentjük, bár a DIGE módszer használatával lényegesen kevesebb ilyen különbség merül fel. Az illesztést követően egy fúziós gélt hoz létre a program, mely a gélképeken detektálható összes spotot tartalmazza. Ezek a spotok még manuálisan szerkeztethetők, hiszen sokszor olyan intenzitásváltozást is fehérje foltként értelmez a program, ami egyébként valamilyen szennyeződés a gélen. A detektált foltokat ezután transzferálhatjuk az összes gélképre, ezáltal lehetségessé válik az eredmények összehasonlítása. A szoftver a fehérjefoltok intenzitását százalékos (V%) adatként határozza meg. A belső standard használata esetén, a standard gélen lévő adott fehérje foltot veszi 100%-nak és ehhez viszonyítja ugyanazon fehérje folt intenzitását a két vizsgálati csoportban. A szoftver figyelembe veszi a pixelek számát és azok szürke (fehér- fekete) skálán kifejezhető intenzitását. Az eredmények statisztikai analíziséhez a kétmintás T-próbát választottuk, a szignifikancia szintet  $p < 0,05$  értékre állítottuk be.



**6. ábra: A szarvasmarha hosszú hátizom minták gélelemzése során használt illesztési stratégia**

(Forrás: Delta2D)

#### **4. 3. 6. Fehérjék azonosítása**

A fehérjék azonosítása a 4.1.6. fejezetben leírtakkal megegyező módon történt.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

### 5. 1. A házityúk máj proteomjának változása szelén indukció hatására

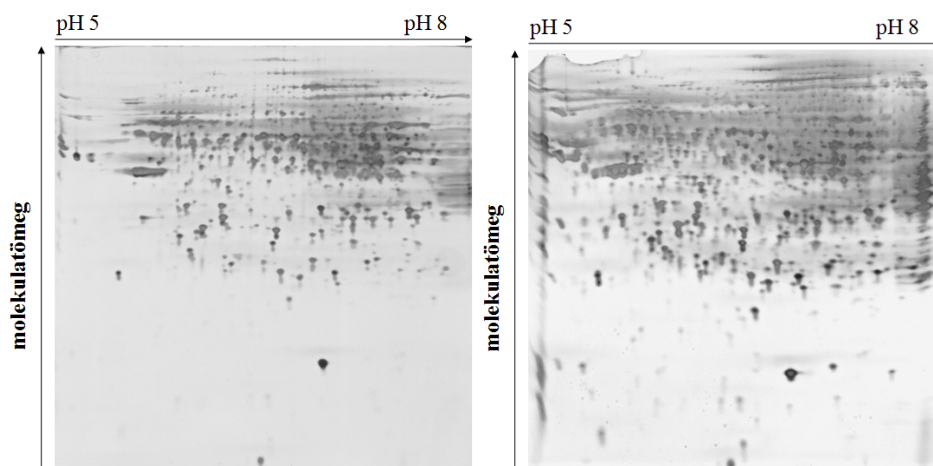
#### 5. 1. 1. A házityúk máj kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézisének optimalizálási eredményei

Vizsgálatunk során számos beállítást teszteltünk a fehérjék izolálása, a pH tartomány, a géltre felvitt fehérjemennyiség, a rehidratáló pufferek összetétele, az izoelektromos fókuszálás kondíciói, az SDS poliakrilamid gél koncentrációja és a festés módja esetén. Ezen beállítások eredményei alapján megállapítottuk, hogy az általunk használt paraméterek közül melyek a legmegfelelőbbek csirkemáj minták kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézisének kivitelezéséhez.

A fehérjék izolálására az általunk használt lízis pufferek közül az ureát, DTT-t és CHAPS-ot magasabb koncentrációban tartalmazó oldatot választottuk, melynek összetétele: 8,5 M urea, 2 M thiourea, 4 m/V% CHAPS, 60 mM DTT, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte ampholyte. Ez a lízis puffer a DeStreak reagenst tartalmazó rehidratáló pufferrel együtt működött a legmegfelelőbben. A Destreak reagens a várakozásoknak megfelelően csökkentette a bázikus régió vízszintes csíkozottságát, a lízis pufferben alkalmazott megemelt kaotrópikus ágens, redukálószer és detergens koncentráció pedig növelte a detektálható fehérjefoltok számát a gélképeken. A kisebb hatékonyságú lízis puffer (8 M urea, 2 M thiourea, 2 m/V% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte) és a DeStreak reagenst tartalmazó rehidratáló puffer alkalmazása esetén a Delta2D gélelemző szoftver segítségével átlagosan 598 (szórás: 48) fehérje foltot detektáltunk a géleken, míg a nagyobb hatékonyságú lízis puffer (8,5 M urea, 2 M thiourea, 4 m/V% CHAPS, 60 mM DTT, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte ampholyte) és a DeStreak reagenst tartalmazó rehidratáló puffer alkalmazásával átlag 704 (szórás: 36) fehérje foltot (7. ábra).

A tisztításnál a Cleanup Kit használata nem javított az elválasztás hatékonyságán, sőt nagymértékű fehérjevesztést okozott. Bizonyos mintatípusok esetén a Cleanup Kit nélkülözhetetlen, vérplazma mintáknál például csökkenti a magas sókoncentrációt, ami egyébként negatívan hat az izoelektromos fókuszálásra. A mintatisztítás során mindig törekednünk kell arra, hogy minél kevesebb tisztítási lépést használjunk,

csökkentve a proteázok károsító hatásának lehetőségét. Tehát egy ilyen tisztító kit használata, csak abban az esetben indokolt, ha szignifikáns javulás érhető el a segítségével. A Cleanup Kit használatával átlag 488 (szórás: 72) fehérjefolt volt detektálható a géleken.



**7. ábra: Csirkemáj minta 2D-PAGE képe a két különböző lízis puffer alkalmazásával**

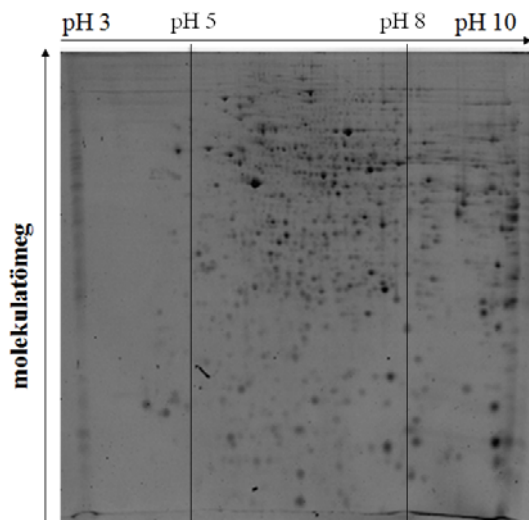
Bal oldali gélkép: 8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte 3/10 ampholyte (lízis puffer), DeStreak-es rehidratáló puffer, 150 µg fehérje, többlépcsős fókuszálás, 13%-os gél, Coomassie G-250

Jobb oldali gélkép: 8,5 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte (lízis puffer), DeStreak-es rehidratáló puffer, 150 µg fehérje, többlépcsős fókuszálás, 13%-os gél, Coomassie G-250

A fehérjék elválasztását pH 3-10 és pH 5-8-as tartományban is elvégeztük. A 8. ábrán látható, hogy a pH 3-4,5 tartományban elhanyagolható a spotok száma, a pH 8-10-es sávban ugyan láthatunk fehérjéket, de mégis érdekesebb ezt a régiót elhagyni annak érdekében, hogy a fehérjék döntő többségét tartalmazó pH 5-8-as tartomány felbontását növeljük, ezáltal a markerfehérjék megtalálásának esélye is nő. Ezek alapján a szelén indukció hatásainak detektálásához a későbbiekben a pH 5-8-as tartományú IPG stripeket használtuk.

A stripekre felvitt optimális fehérjemennyiség kiválasztását kizárólag a festési eljárással párhuzamosan lehet tesztelni, hiszen a különböző festékek különböző érzékenységek. A csirkemáj minták esetén egy ezüsfestéssel közel azonos érzékenységű Colloidal Coomassie G-250-es festést, illetve egy ultraérzékenységű

ezüsthfestést alkalmaztunk. Az ezüsthfestés esetén már 20 µg-nyi fehérje elegendő volt a kétdimenziós elválasztáshoz, a detektált fehérje foltok száma átlag 710 (szórás: 40) volt. Ezzel szemben a Coomassie festésnél 150 µg volt az a fehérje mennyiség, ahol a spotok még nem folytak össze, de számuk az ezüsthfestés során azonosított folt számmal közel azonos volt (átlag: 698, szórás: 33). A 9. ábrán egy olyan gélképet mutatunk be, melynél a felvitt fehérje mennyisége 300 µg volt. Látható, hogy a pH 5-8-as, 70-240 kDa-os tartományban, ahol a legtöbb fehérjét várnánk, nem tudunk megkülönböztetni egyedi pontokat, mert a nagy anyagmennyiség miatt azok összemosódnak. Annak ellenére, hogy mindkét festék megfelelően működött, mi mégis a Colloidal Coomassie G-250-es festést választottuk. Ennek az az oka, hogy a tömegspektrometriás analízis során a coomassie-val festett spotokat sokkal könnyebb kezelni, ugyanis a festék kivonása lényegesen egyszerűbb, mint az ezüsthfestett spotok esetében. Illetve azt is figyelembe vettük, hogy a nagyon kis mennyiségű fehérje minta felvitele esetén (20 µg az ezüsthfestésnél) megnőhet a mintafelvitel pontatlanságból eredő eltérések száma a gélképeken.

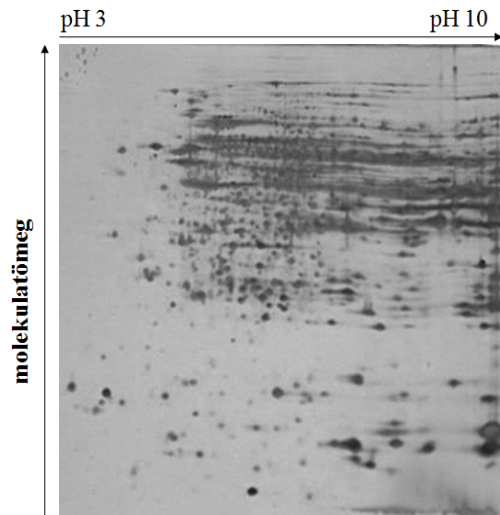


#### 8. ábra: Csirkemáj minta 2D-PAGE gélképe pH 3-10-es tartományban

8,5 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte (lízis puffer), DeStreak-es rehidratáló puffer, 150 µg fehérje, többlépéses fókuszálás, 13%-os gél, Coomassie G-250

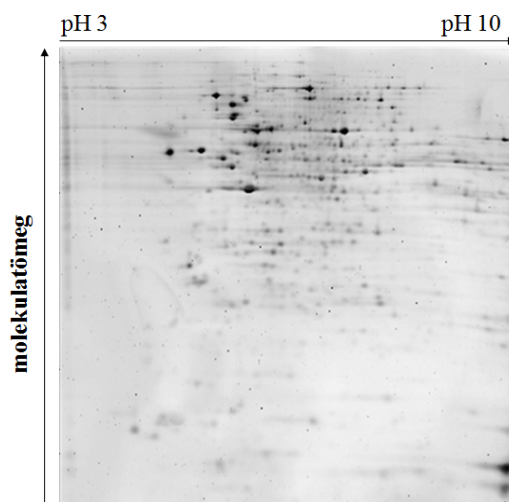
Az izoelektromos fókuszálás során kétféle beállítást teszteltünk (egy- és többlépéses fókuszálás). Az egylépéses fókuszálással nem értük el a kívánt eredményt, az 10. ábrán látható, hogy számos vízszintes csík megjelent a gélképen. Ennek a jelenségeknek a hátterében a nem megfelelő izoelektromos fókuszálás áll (2D-DOCTOR, BIO-RAD). Mivel mindkét típusú fókuszálás esetén összesen 20000 Vh volt a teljes feszültség X idő szorzat, ezért nem az okozta a problémát, hogy ez az érték túl alacsony volt. A

többlépéses fókuszálás során az első lépésben egy alacsony feszültség értéket használtunk (250 V) és csak ezután kezdtük lineárisan növelni, majd csak a harmadik lépésben került sor gyors feszültség emelésre. Valószínűleg ez a kezdeti alacsony feszültség segít a fehérjéknek, hogy megkezdjék migrációjukat a gélben a saját izoelektromos pontjuk felé. Ezzel ellentétben az egylépéses fókuszálás gyorsan emelkedő feszültsége nem kedvez a nagy molekulatömegű fehérjéknek. Ezek alapján a választottuk a többlépéses fókuszálást a további futtatásokhoz.



**9. ábra: Csirkemáj minta 2D-PAGE gélképe 300 µg fehérje esetén**

8,5 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte (lízis puffer),  
DeStreak-es rehidratáló puffer, többlépéses fókuszálás, 13%-os gél, Coomassie G-250



**10. ábra: Csirkemáj minta 2D-PAGE képe egylépéses izoelektromos fókuszálás alkalmazásával**

8,5 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte (lízis puffer),  
DeStreak-es rehidratáló puffer, 20 µg fehérje, 13%-os gél, ezüsfestés

A második dimenzióban történő molekulatömeg szerinti elválasztás során különböző akrilamid koncentrációjú (%T) géleket teszteltünk. A 10%-os koncentráció túl alacsonynak bizonyult, ugyanis a nagy molekulatömegű fehérjék nem váltak el egymástól a futtatás ideje alatt. Ha pedig növeltük volna a futtatási időt, akkor a kis molekulatömegű fehérjék kifutottak volna a gélből. A 15%-os poliakrilamid gél esetén nagymértékben megnőtt a futtatási idő, viszont az elválasztás hatékonysága nem növekedett. A 13%-os gélek mind a futtatási idő szempontjából, mind az elválasztás hatékonyságának szempontjából ideálisnak bizonyultak, ezért a továbbiakban ezt a koncentrációt alkalmaztuk.

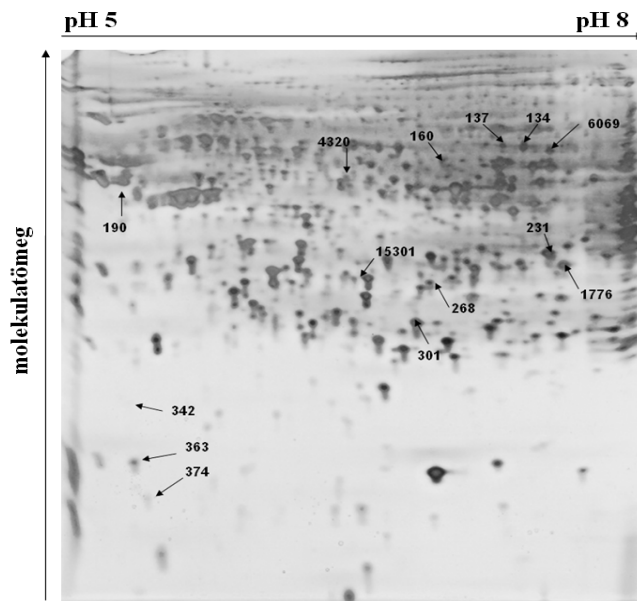
Az optimalizálás során kiválasztott ideális paraméterek összefoglalása a 6. táblázatban látható.

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

<b>Fehérjék izolálása (lízis pufferek)</b>	- 8,5 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte
<b>Alkalmazott pH tartomány</b>	pH 5-8
<b>Fehérjemennyiség</b>	150 µg
<b>Rehidratáló puffer összetétele</b>	- 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
<b>Izoelektromos fókuszálás kondíciói</b>	Több lépésben: 1. lépés -250 V 15 perc 2. lépés -4000 V 2,5 óra 3. lépés -4000 V 20000Vh
<b>SDS poliakrilamid gél koncentrációja</b>	13%
<b>Festés módja</b>	Coomassie G-250

## 5. 1. 2. A kontroll és a kezelt csoport máj proteomjának összehasonlítása során kapott eredmények

Munkánk során elvégeztük a kontroll és a kezelt csoport máj szövetének összehasonlító proteomikai elemzését. Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézist használtunk a fehérjék elválasztásához és Colloidal Coomassie G-250 festéssel tettük láthatóvá a spotokat. Átlagosan 708 (szórás: 44) fehérjefoltot detektáltunk egy-egy gélen. A 708 fehérjefolt közül, 18 folt intenzitásában tapasztaltunk szignifikáns különbséget ( $p < 0,05$ ), ezek közül 14 fehérjét sikerült tömegspektrométerrel azonosítani (11. ábra). 8 spot intenzitása a kezelt csoportban volt magasabb, míg 6 spot esetén a kontroll csoportban detektáltunk nagyobb expressziós szintet (7. táblázat). Az utóbbi esetben valójában azt látjuk, hogy a kezelés (emelt szelén bevitel) hatására ezen fehérjék kevésbé expresszálódnak. Az azonosított fehérjék neve és Uniprot adatbázisbeli azonosítója a 8. táblázatban szerepel.



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

8,5 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte (lízis puffer), DeStreak-es rehidratáló puffer, 150  $\mu$ g fehérje, többlépéses fókuszálás, 13%-os gél, Coomassie G-250

**7. táblázat: A kontroll és a szelénnel kezelt csoport között expressziós különbséget mutató spotok átlag V% (intenzitás) és szórás értékei**

Spot	Csoport	Átlag	Szórás	Szignifikancia szint (P)
134	kontroll	0,370	0,043	0,002
	kezelt	0,195	0,066	
137	kontroll	0,245	0,051	0,009
	kezelt	0,141	0,029	
160	kontroll	0,161	0,099	0,008
	kezelt	0,366	0,056	
190	kontroll	0,172	0,053	0,003
	kezelt	0,416	0,120	
231	kontroll	0,851	0,099	0,008
	kezelt	0,605	0,098	
268	kontroll	0,374	0,049	0,005
	kezelt	0,529	0,066	
301	kontroll	0,589	0,041	0,003
	kezelt	0,726	0,055	
342	kontroll	0,049	0,011	0,009
	kezelt	0,025	0,006	
363	kontroll	0,060	0,007	0,004
	kezelt	0,021	0,005	
374	kontroll	0,018	0,020	0,000
	kezelt	0,088	0,003	
1776	kontroll	0,740	0,066	0,008
	kezelt	0,935	0,093	
4320	kontroll	0,160	0,050	0,015
	kezelt	0,272	0,037	
6069	kontroll	0,271	0,039	0,007
	kezelt	0,148	0,041	
15301	kontroll	0,142	0,025	0,015
	kezelt	0,187	0,012	

A kezelt csoportban megemelkedett expressziós szintet mutató fehérjék:

A 160-as fehérje foltban azonosított peptidek az általunk használt fehérje adatbázisban (teljes Uniprot adatbázis, mely a Swiss-prot és a TrEMBL adatbázisokat tartalmazza) házityúk esetén egy „Uncharacterized protein”-nél mutatták a legnagyobb szekvencia lefedettséget. Az Uniprot adatbázisban „Uncharacterized protein”-ként szereplő fehérjéket még nem írták le abban az adott fajban, ezért a nukleotid szekvenciájuk alapján határozzák meg a fehérje szekvenciát. Ezek a fehérjék a szekvencia hasonlóságok alapján besorolhatók fehérje családokba, illetve a funkciójukra is lehet következtetni. Az általunk azonosított fehérje az aldehid dehidrogenázok csoportjába tartozik, és szekvenciája alapján a szarvasmarha „alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase” fehérjével homológ. Ez a fehérje egy multifunkcionális enzim, mely közvetítőként vesz részt a sejtek védő mechanizmusaiban. Egyik feladata,

hogy a betain aldehidből betaint állít elő, ami egy fontos ozmolit és metil donor, valamint antioxidáns funkciót is betölt. Másik fontos szerepe, hogy védi a sejteket az oxidatív stressztől azáltal, hogy metabolizálja a lipid peroxidáció során keletkezett aldehideket. Mindezekon kívül még a lizin katabolizmusban is részt vesz (FONG és mtsai, 2006, BROCKER és mtsai, 2010). A kontroll csoporthoz képest a kezelt csoportban 2,3-szor magasabb volt ennek az enzimnek az expressziója.

**8. 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 peptidok száma/% szekvencia lefedettség <sup>1</sup>	Elméleti pI/Mw (Da) <sup>2</sup>	Arány <sup>3</sup>
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

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

<sup>2</sup> Swissprot adatbázisban szereplő izoelektromos pont/molekulasúly értékek

<sup>3</sup> A kontroll csoporthoz viszonyított arány a V% értékek alapján

A 190-es spotban azonosított fehérje 2,4-szer magasabb expressziós szintet mutatott a kezelt csoportban. Citoplazmatikus aktinként azonosítottuk ezt a fehérjét, mely a májsejtek fehérjéinek 2%-át teszik ki. Ezek a proteinek szerepet játszanak a sejtek belső vázának, a citoszkeletonnak a létrehozásában, ezáltal a sejtek alakjának kialakításában, valamint a belső transzportfolyamatok kivitelezésében, jelátviteli folyamatokban és a sejtosztódásban is kulcsfontosságúak (SMALL és mtsai, 1999).

A proteaszóma alfa típusú alegység fehérjéjét azonosítottuk a 268-as spotban, melynek intenzitása 1,4-szer nagyobb volt a kezelt csoportban a kontrollhoz képest. A proteaszóma egy proteináz komplex, mely a szükségtelenné vált, vagy degradálódott fehérjék lebontását végzi a citoplazmában. Bizonyos peptidkötéseknél képes hasítani a fehérjéket, így hét-nyolc aminosav hosszúságú peptidláncok keletkeznek. A proteaszómális degradációs útvonal nagyon fontos a sejtek életfolyamataiban, részt vesz a sejt ciklus kialakításában, a génexpresszió szabályozásában és az oxidatív stresszre adott válaszban (MURATA és mtsai, 2009). A proteaszóma maga egy henger alakú szerkezet, melynek belsejében található a proteolitikusan aktív rész, négy, gyűrű alakú központi egységként. A belső két gyűrűt a béta-alegységek építik fel, melyek az aktív proteáz helyeket tartalmazzák, míg a két külső gyűrű az alfa alegységeket foglalja magába, melyek tulajdonképpen kapuként funkcionálnak, eldöntve mely proteinek léphetnek be a proteaszóma komplexbe (KÖHLER és mtsai, 2001; JUNG és mtsai, 2009).

Egy antioxidáns enzimet azonosítottunk a 301-es spotban, ez a peroxiredoxin 6, melynek expressziója 1,2-szer volt nagyobb a kezelt csoportban. A peroxiredoxinok családjába tartozó enzimek, a citokinek által indukált peroxid szintet szabályozzák és jelátviteli folyamatokban közvetítőként működnek közre (RHEE és mtsai, 2005). A többi peroxiredoxinnal ellentétben ez a típus nem szelénfüggő (KANG és mtsai, 1998). Az enzim kettős funkcióval rendelkezik, részt vesz a sejtek redox szabályozásában, redukálja a hidrogén-peroxidot, a rövid láncú zsírsavakat és a foszfolipid hidroxiperoxidokat. Mindezek mellett foszfolipáz aktivitása is van, így a foszfolipid metabolizmusban is szerepet játszik (CHAE és mtsai, 1994; FISHER, 2011). Oxidatív stressz hatására nő az expressziója (KIM és mtsai, 2003).

A 374-es foltban azonosított „ADF actin binding protein” esetén a kezelt csoportban 4,8-szoros expressziós különbséget detektáltunk a kontrollhoz képest. Az aktin depolimerizáló faktorok (ADF), a mikrofilamentumok közé tartoznak. Az általunk azonosított aktin kötő fehérje a citoskeletális aktin szabályozásában vesz részt, azáltal, hogy kalciumtól függetlenül képes az F-aktinhoz (fibrilláris aktin) kötődni, de nincs közvetlen szerepe az aktin depolimerizációban (CARLIER és mtsai, 1997). Az 5-lipoxigenáz chaperonjaként is funkcionál, ez az enzim az immunsejtek leukotrién bioszintézisében vesz részt (RAKONJAC és mtsai, 2006).

1776-os foltban a malát dehidrogenáz enzim citoplazmában előforduló izoformáját azonosítottuk, melynek expressziója 1,3-szor volt nagyobb a kezelt csoportban. Számos izoformája létezik ennek az enzimnek, de a citoplazmatikus és a mitokondriális a legfontosabbak. A mitokondriális változat a citromsav-ciklus egyik kulcsenzime, mely a malát oxidációját katalizálja (MUSRATI és mtsai, 1998). Az általunk is azonosított citoplazmatikus forma a malát-aszpartát inga része. Ez egy speciális mechanizmus (redox inga), mely lehetővé teszi, hogy a citoszolban, például a glükóz lebontásakor keletkezett redukált koenzimekről a hidrogének bejussanak a terminális oxidációba. Így a citoszolban keletkező NADH redukív kapacitása a mitokondriumban található  $\text{NAD}^+$  NADH-vá redukálásaként jelenik meg a membrán mindkét oldalán megtalálható enzimek közreműködésével. A citoplazmatikus malát dehidrogenáz reverzibilisen katalizálja a malát oxidációt oxálecetsavvá a  $\text{NAD}^+$  redukálásával NADH-vá (MINÁRIK és mtsai, 2002).

Az enolázok családjába tartozó alfa-enoláz egy glikolitikus enzim, melyet a 4320-as spotban azonosítottunk. Az enoláz enzimek a glikolízis utolsó előtti lépésében lejátszódó 2-foszfoglicerát - foszfoenolpiruvát konverziót katalizálják (PESHAVARIA és DAY, 1991). Az enolázoknak három izoformája ismert, az alfa, a béta és a gamma. Az alfa-enoláz sokféle szövetben expresszálódhat, a gamma-enoláz csak az idegrendszeri sejtekben jelenik meg, a béta-enoláz pedig egy izom-specifikus fehérje, mely a harántcsíkolt izmokban fejeződik ki (CHEN és mtsai, 1976). A 4320-as spot intenzitása 70%-kal volt nagyobb az emelt szelén tartalmú takarmánnyal etetett csoport egyedeiben.

A 15301-es foltban egy „3-mercaptopyruvate sulfurtransferase” nevű fehérjét azonosítottunk, mely a sejtek mitokondriumában lokalizálódik. Az enzim a 3-mercaptopiruvát + cianid-ból történő piruvát + tiocianát termelődést katalizálja (VACHEK és WOOD, 1972). Antioxidáns enzimnek tekinthető, hiszen a szervezet számára káros cianidból, egy kevésbé toxikus tiocianátot állít elő. Emellett ez az enzim képes a szelén megkötésére és hatékony szállítására is, valamint a cisztein-metabolizmusban is részt vesz (OGASAWARA és mtsai, 2005). E fehérje esetén 1,3-szor nagyobb expressziós szintet detektáltunk a szelénes csoportban a kontrollhoz viszonyítva.

A kezelt csoportban lecsökkent expressziós szintet mutató fehérjék:

134-es és 137-es spotban is a foszfoenolpiruvát karboxikináz fehérjét azonosítottunk. Valószínűleg egy poszt-transzlációs módosítás következménye, hogy két különböző pI pozícióban ugyanaz a fehérje volt jelen. A 134-es és a 137-es folt esetében is a kezelt csoportban ennek az enzimnek közel felére csökkent az expressziója. A foszfoenolpiruvát karboxikináz fehérje egy enzim, mely GTP felhasználásával katalizálja az oxálecetsavból történő foszfoenolpiruvát szintézist a glükoneogenezisben (DELBAERE és mtsai, 2004). A glükoneogenezis az a folyamat, mely során a laktátból és egyéb citromsav ciklus intermedierekből glükóz képződik, a glükóz homeosztázisában esszenciális ez az útvonal. A foszfoenolpiruvát szintézise részben a mitokondriumban részben a citoplazmában játszódik le. Ez a lépés képes a glükoneogenezis sebességét szabályozni. A glükoneogenezis során, egy-két kivételtől eltekintve, a glikolízis enzimek működnek fordított irányban, de a piruvát kináz, mely a foszfoenolpiruvát-piruvát átalakulást katalizálja, irreverzibilis, ezért a foszfoenolpiruvát karboxikináz egy alternatív utat biztosít a piruvát kinázzal ellentétes irányú reakció kialakítására (YANG és mtsai, 2009). A vér glükózszintje befolyásolja a foszfoenolpiruvát karboxikináz expresszióját, illetve a glukagon és kortizol hormonok ürülésének mértéke is hatással van az enzim mennyiségére (HANSON, 1997).

A 231-es spotban lévő fehérjét „Uncharacterized protein”-ként azonosítottuk az Uniprot adatbázis alapján. A tőkés réce fajban már leírásra került ez a fehérje, glicerol-3-foszfát-dehidrogenáz néven. Ez egy NAD<sup>+</sup> függő enzim, mely a dihidroxi-aceton-foszfát reverzibilis redox átalakulását katalizálja glicerol 3-foszfáttá. A dihidroxi-

aceton-foszfát a májban és a zsírszövetben a glükózból a glikolízis során keletkezik, és redukcióval a glicerol-3-foszfát-dehidrogenáz hatására alakul ki a glicerol-3-foszfát (OU és mtsai, 2006). Ez az enzim mind a szénhidrát metabolizmusban, mind a zsírsav metabolizmusban részt vesz. A szervezetben a zsírsavak trigliceridek formájában raktározódnak. A trigliceridek a májban és a zsírszövetben keletkeznek. A trigliceridek szintézisének egyik fontos útvonalában az aktivált zsírsav a glicerol-3-foszfáthoz kapcsolódik (HARDING és mtsai, 1975). Az enzim expressziója 40%-os csökkenést mutatott a kezelt csoportban.

A 342-es spotban egy génexpressziót is befolyásoló RNS kötő fehérjét azonosítottunk, ez az „RNA-binding protein 8A”. Az exonok kapcsolódását jelző multiprotein komplex részét képezi ez a fehérje. A komplex feladata az exon-exon határok pozíciójának jelzése az érett mRNS molekulán (DREYFUSS et. al., 2002). Az általunk azonosított fehérje a komplex központi részét képezi, mely az mRNS-hez való kötődést biztosítja a teljes mRNS metabolizmuson keresztül. Így részt vesz például a magi mRNS transzportjában, az mRNS-ek sejten belüli lokalizációjában és transláció hatékonyságának szabályozásában (HIR és mtsai, 2001). A kezelt csoportban közel felére csökkent az RNS kötő fehérje expressziója.

A 363-as foltban egy másik RNS-kötő fehérjét azonosítottunk, ez az „eukaryotic translation initiation factor 5A-1”, expressziója harmadára csökkent a kezelt csoportban. Ez a fehérje már a transláció kezdő lépésében kapcsolódik az mRNS-hez és az elongáció során is jelen van, a riboszóma kis és nagy alegységének összekapcsolódását segíti, emellett GTP-áz aktivitás aktivizálására is képes (HIR és mtsai, 2006). Funkciója sokrétű, részt vesz az apoptózis szabályozásában, a sejtciklus kialakításában, az aktin fehérje dinamikájának szabályozásában és az mRNS szint szabályozásában is (TAYLOR és mtsai, 2007).

A 6069-es foltban azonosított fehérje szintén „Uncharacterized protein”-ként van feltüntetve az Uniprot adatbázisban. Ezen fehérje esetén nem tudtunk konkrét fehérje homológot megadni, mivel az adatbázisban még nem szerepel ilyen, viszont a fehérje adatbázisból kiderül, hogy az acetyl-CoA dehidrogenázok családjába tartozik ez az ismeretlen fehérje. Ezek az enzimek a zsírsavak béta-oxidációjának kezdeti lépését katalizálják a sejtek mitokondriumában, FAD kofaktor szükséges ahhoz, hogy a

szubsztráthoz tudjanak kapcsolódni (THORPE és KIM, 1995). A béta-oxidáció a zsírsav lebontás első lépése, a folyamat során a hosszú szénláncú zsírsavakból acetyl-CoA molekulák keletkeznek, melyek később a citromsav ciklusba lépnek be és folytatják tovább metabolikus útjukat (SCHULZ, 2008). A kezelt csoportban közel felére csökkent ennek a fehérjének az expressziója.

Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a szelén csökkentette a glükoneogenezis intenzitását, hiszen a kezelt csoportban majdnem felére csökkent a foszfoenolpiruvát karboxikináz expressziója, mely képes a glükoneogenezis sebességét szabályozni. Hasonló eredményre jutottak IIZUKA és munkatársai (1993) is patkányok esetén, megállapították, hogy szelén hatására szignifikánsan csökkent a glükoneogenezis sebességét befolyásoló enzimek mennyisége, viszont a glikolízisben résztvevő néhány enzim mennyisége szignifikánsan megnövekedett. BECKER és munkatársai (1996) is megállapították, hogy szelén hatására csökkent a glükoneogenezis enzimeinek (köztük a foszfoenolpiruvát karboxikináz is) aktivitása, valamint az ezen enzimeket kódoló génekről átíródó mRNS mennyisége is. A glükoneogenezis 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. A szelén okozta foszfoenolpiruvát karboxikináz expresszió csökkenés a foszfoenolpiruvát mennyiségét is csökkentette, ennek ellensúlyozásaként emelkedhetett az alfa enoláz expressziójának mértéke (12. ábra).

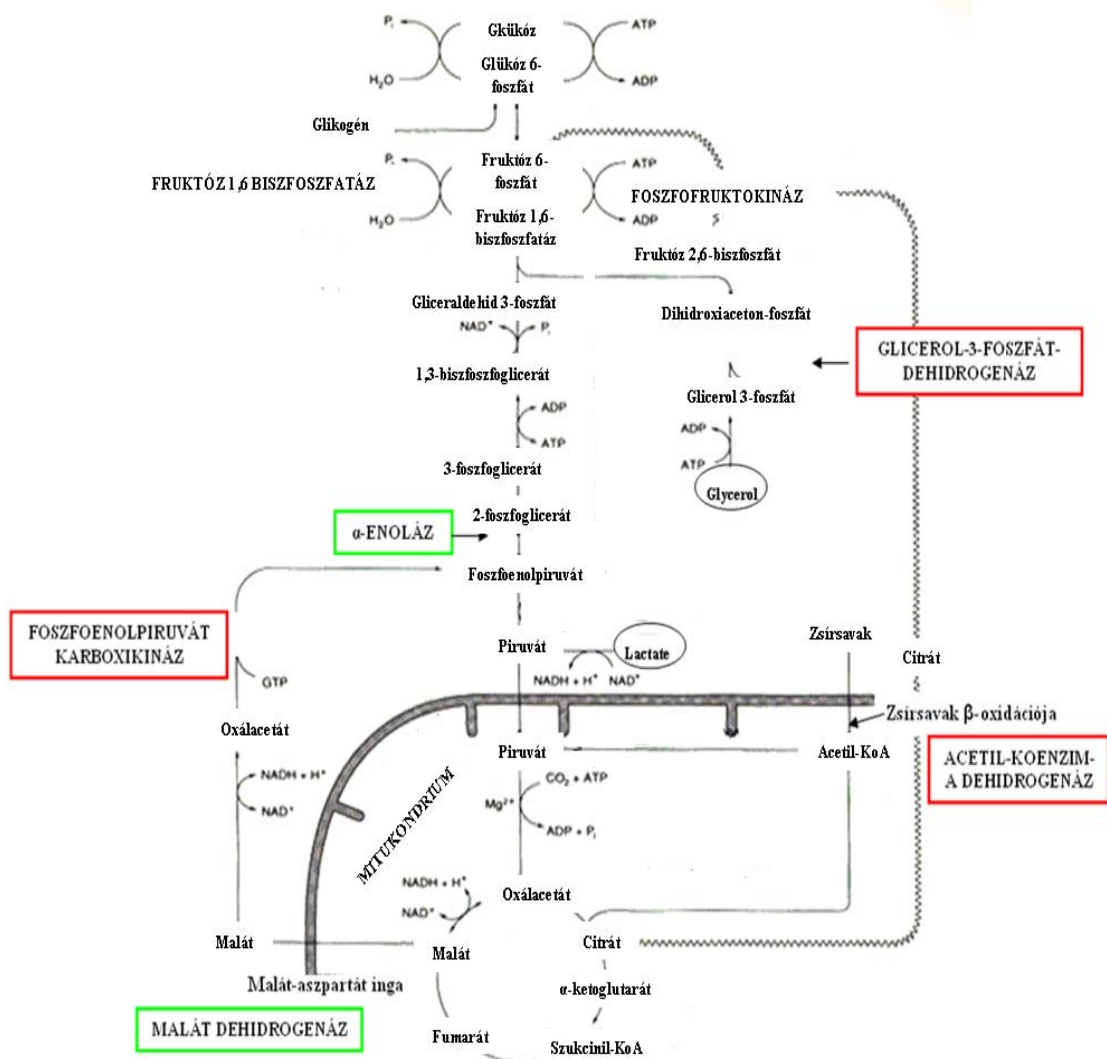
Az alkalmazott kezelés a zsírsavak metabolizmusára is hatással lehetett. Ezt az alapján feltételezzük, hogy a glicerol-3-foszfát-dehidrogenáz enzim expressziós szintje lecsökkent a kezelt csoportban. A glicerol-3-foszfát-dehidrogenáz által katalizált reakció végterméke a glicerol-3-foszfát, melyhez a trigliceridek szintézisének egyik útvonalában az aktivált zsírsav kapcsolódik. 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-CoA dehidrogenáz expressziót tapasztaltunk. Ezek az enzimek a zsírsavak béta-oxidációjának kezdeti lépését katalizálják, a béta-oxidáció a zsírsav lebontás egyik első lépése (12. ábra). CZAUDERNA és munkatársai (2011) patkányokon végzett vizsgálataik során megállapították, hogy már 0,5 mg/kg

mennyiségben alkalmazott szelén csökkentette a telített zsírsavak mennyiségét. Hasonló eredményre jutottak nutriák vizsgálata esetén is (GLOGOWSKI és mtsai, 2013), a takarmánykeverékben 0,36 mg/kg szelént alkalmaztak és megállapították, hogy a zsírsavak mennyisége szignifikánsan lecsökkent a májban.

A két csoport közötti legnagyobb expressziós különbséget a citoskeletonális 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 citoskeletonális aktin mennyisége és ezzel együtt az aktin szabályozását végző fehérjék expressziója is. Az irodalomban nem találtunk arra vonatkozóan konkrét adatokat, hogy a szelén befolyásolja-e az aktin és a hozzá kapcsolódó fehérjék expresszióját. MIYAGUCHI (2004) egy tanulmányban arról számolt be, hogy a szelén kötő fehérje az aktin monomerek összeépülését segíti, ez közvetet bizonyíték lehet a szelén és az aktin fehérje közötti kapcsolatra. 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, a citoskeletonális aktin ezen folyamatok kivitelezésében is kulcsfontosságú, 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. A peroxiredoxin-6 redukálja a hidrogén-peroxidot, a rövid láncú zsírsavakat és a foszfolipid hidroxiperoxidokat. A „3-mercaptopyruvate sulfurtransferase” fehérje a káros cianidot alakítja át és képes a szelén megkötésére és szállítására is. 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 takarmánykeverékekben alkalmazható mennyiséget) már lehetnek káros hatásai. A túlzott szelén bevitel károsíthatja az antioxidáns rendszert, a glutation-peroxidázok aktivitása csökken (GAÁL, 1998), a lipid peroxidációs folyamatok intenzitása viszont nő, mely nekrotikus szövetkárosodást is okozhat,

sejtmembránok károsodhatnak, enzimműködés gátlás alá kerül (FEE és TEITELBAUM, 1972; 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, ez a komplex a degradálódott fehérjék lebontását végzi, valószínűsítjük, hogy az antioxidáns rendszer károsodásával párhuzamosan számos fehérje is degradálódik.



**12. ábra: A szénhidrát metabolizmus fontosabb lépései és a zsírsav metabolizmushoz való kapcsolódási pontjai**

zöld jelölés: szelén hatására megemelkedett expresszió, piros jelölés: szelén hatására lecsökkent expresszió

(ZAPARTY és mtsai, 2009; ZHU és mtsai, 2012 nyomán)

## **5. 2. Különböző genotípusú növendék kosok hosszú hátizom szövetének proteomikai elemzése**

### **5. 2. 1. Juh hosszú hátizom kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézisének optimalizálási eredményei**

A juh hosszú hátizom 2D-PAGE metodika optimalizálása során számos beállítást teszteltünk a lízis pufferek, a pH tartomány, a rehidratáló pufferek és az izoelektromos fókuszálás esetén.

Tudomásunk szerint ezidáig két olyan közlemény látott napvilágot, mely juh izomszövet proteomikai vizsgálatával foglalkozik (HAMELIN és mtsai, 2007; DE ALMEIDA és mtsai, 2013). A két tanulmányban teljesen más protokoll szerepel a fehérjék izolálására vonatkozóan (mindkét esetben kb. 300 spot detektálható a géleken). Ez nem meglepő a proteomikában, hiszen egy adott szövettípusra nézve számos különböző protokollal találkozhatunk a szakirodalomban. Azonban egyik sem mondható általános érvényűnek, mely minden laboratóriumban, minden kísérleti beállítás mellett működik.

Vizsgálatunkban a fehérjék izolálására kétféle lízis puffert teszteltünk:

- 8 M urea, 2 M thiourea, 2 m/V% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte ampholyte (1-es lízis puffer). Ez egy általános összetételű lízis puffer, mely tartalmazza azokat a vegyszereket (jellemzően ezen koncentrációkban), melyeket izomszövet esetén gyakran használnak állatfajtól függetlenül.

- 8,5 M urea, 2 M thiourea, 2 m/V% CHAPS, 65 mM DTT, 40 mM Tris pH8, 1 mM EDTA, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte ampholyte (2-es lízis puffer). A második lízis puffernél megemeltük az urea és a redukáló szer koncentrációját, ennek az volt a célja, hogy a nehezen oldatba vihető fehérjék mennyiségét növeljük a mintánkban. A kis koncentrációban hozzáadott EDTA a fémionok megkötésére szolgál, melyek a későbbiekben a zavart okozhatnak az izoelektromos fókuszálás során. A lízis pufferhez adott Tris a pH-t stabilizálja.

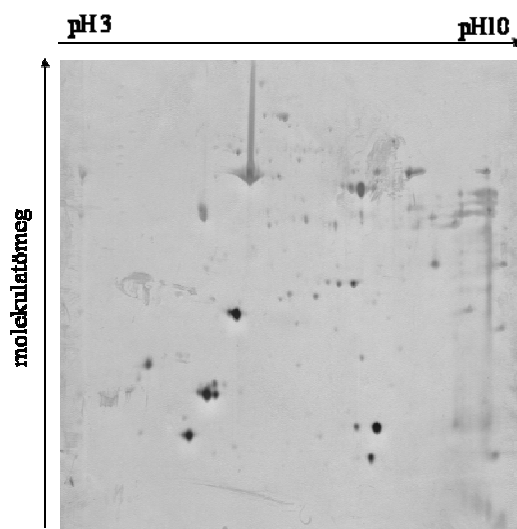
A megfelelő lízis puffer kiválasztását a megfelelő rehidratáló puffer kiválasztásával párhuzamosan végeztük. A rehidratáló puffer esetén is két kombinációt teszteltünk:

- normál rehidratáló oldat: 8 M urea, 2 M thiourea, 2 m/V% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte ampholyte, 0,002 m/V% brómfenolkék

- DeStreak rehidratáló oldat: 8 M urea, 2 M thiourea, 2 m/V% CHAPS, 15 mg/ml DeStreak reagens, 0,2 V/V% 100X Bio-Lyte ampholyte, 0,002 m/V% brómfenolkék

A rehidratáló pufferek a redukáló ágens típusában különböztek. Néhány szövettípus esetén a DeStreak reagens csökkenti a poliakrilamid gélek bázikus régiójában gyakran előforduló vízszintes csíkozottságot.

A két lízis puffer és a két rehidratáló puffer tesztelése négy kombinációban történt. Legjobb eredményt az 1-es lízis puffer és a DTT tartalmú rehidratáló puffer kombinációjával értük el. Megállapítottuk, hogy a DeStreak reagens használata egyik lízis puffer esetén sem csökkentette a bázikus régió csíkozottságát, ezért használata nem indokolt (13. ábra). Az 1-es és 2-es lízispuffer használata során szignifikáns különbség mutatkozott a fehérje foltok számát illetően. A Delta2D gélelemző szoftver használatával megállapítottuk, hogy az 1-es lízis puffer alkalmazásával átlagosan 310 (szórás: 33) fehérjefolt detektálható a géleken, míg a 2-es puffer esetén átlagosan 200 (szórás: 29) fehérjefolt. Ebből egyértelműen kiderül, hogy az irodalomba általánosan közölt pufferösszetétel a juh izomszövet esetén nagyobb hatékonysággal működik.

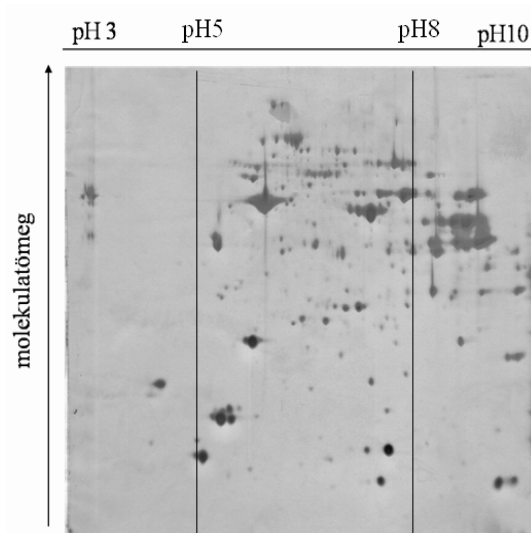


**13. ábra: Juh vázizom 2D-PAGE képe a 2-es lízis puffer és a DeStreak-es rehidratáló puffer alkalmazásával**

8,5 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 65 mM DTT, 40 mM Tris pH8, 1 mM EDTA, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte (lízis puffer), többlépéses fókuszálás

A fehérjék elválasztását pH 3-10 és pH 5-8-as tartományban végeztük el. Az 14. ábrán látható, hogy a pH 3-5 tartományban elhanyagolható a spotok száma, a pH 8-10-

es sávban ugyan láthatunk fehérjéket, de ez a régió a már fentebb emített bázikus csíkozottság miatt az elemzés során mindig nehezen értelmezhető, ezért érdekesebb ezt a régiót is elhagyni és inkább a középső (pH 5-8) tartomány felbontását növelni. Ezek alapján a két fajta közötti különbségek azonosításához a későbbiekben a pH 5-8-as tartományú IPG stripeket használtuk.

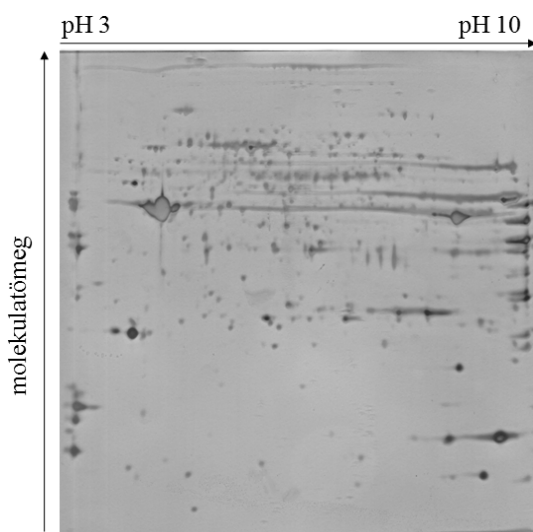


**14. ábra: Juh vázizom 2D-PAGE képe pH 3-10-es tartományban**

8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte (lízis puffer),  
töbllépéses fókuszálás, normál rehidratáló oldat

Az izoelektromos fókuszálás során kétféle beállítást teszteltünk (egy- és töbllépéses fókuszálás). Az egylépéses fókuszálással nem értük el a kívánt eredményt. A 15. ábrán látható, hogy számos vízszintes csík megjelent a gélképen, ennek az az oka, hogy az adott foltban található fehérjék egy része a fókuszálás ideje alatt nem tudott a saját izoelektromos pontjára vándorolni. Ennek a jelenségeknek a hátterében a nem megfelelő izoelektromos fókuszálás áll (INTERNET 4). Mivel mindkét típusú fókuszálás esetén összesen 50000 Vh volt a teljes feszültség X idő érték, ezért nem az okozta a problémát, hogy ez az érték túl alacsony volt. A töbllépéses fókuszálás során az első lépésben egy alacsony feszültség értéket használtunk (250 V) és csak ezután kezdtük lineárisan növelni, majd csak a harmadik lépésben került sor gyors feszültség emelésre. Valószínűleg ez a kezdeti alacsony feszültség segít a fehérjéknek, hogy megkezdjék migrációjukat a gélben a saját izoelektromos pontjuk felé. Ezzel ellentétben az egylépéses fókuszálás gyorsan emelkedő feszültsége nem kedvez a nagy

molekulatömegű fehérjéknek. Ezek alapján választottuk a többlépcsős fókuszálást a további frakcionáláshoz.



**15. ábra: Juh vázizom 2D-PAGE képe egylépcsős izoelektromos fókuszálás alkalmazásával**

8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte (lízis puffer), normál rehidratáló oldat

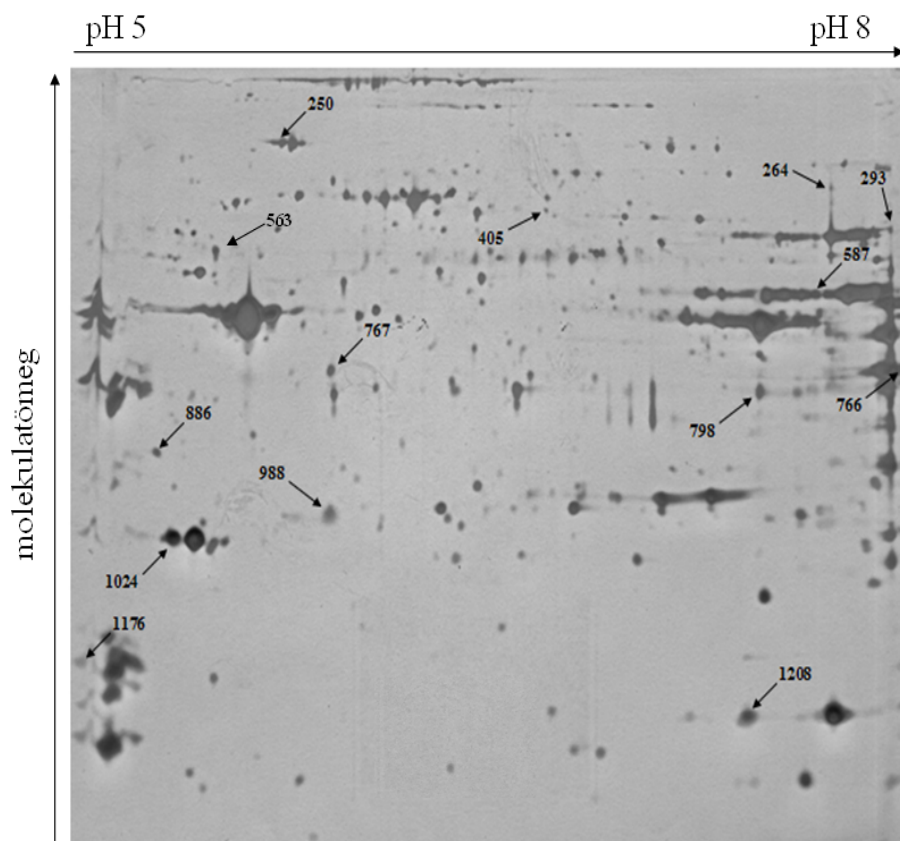
Az optimalizálás során kiválasztott ideális paraméterek összefoglalása a 9. táblázatban látható.

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

<b>Fehérjék izolálása (lízis pufferek)</b>	- 8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte
<b>Alkalmazott pH tartomány</b>	pH 5-8
<b>Rehidratáló puffer összetétele</b>	- normál rehidratáló oldat: 8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte, 0,002% brómfenolkék
<b>Izoelektromos fókuszálás kondíciói</b>	Több lépésben: 1. lépés - 250 V 20 perc 2. lépés - 10000 V 2,5 óra 3. lépés - 10000 V 50000Vh

## 5. 2. 2. A cigája és szapora merinó fajták között fehérjeszinten mutatkozó különbségek

Munkánk során elvégeztük a szapora merinó és a cigája fajták hosszú hátizom szövetének összehasonlító proteomikai elemzését. Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézist használtunk a fehérjék elválasztásához és ezüstoffestéssel tettük láthatóvá a spotokat. 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 (16. ábra). 9 fehérje spot a szapora merinóban, 5 pedig a cigájában mutatott magasabb expressziós szintet. 4 spot  $p < 0.01$ , 8 spot  $p < 0.05$  és 2 spot  $p = 0.05$  (10. és 11. táblázat) szinten volt szignifikáns. Az azonosított fehérjéket funkciójuk alapján három csoportba soroltuk: struktúrfehérjék, szénhidrát metabolizmushoz köthető fehérjék és egyéb feladatot ellátó fehérjék.



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

8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% 100X Bio-Lyte ampholyte (lízis puffer), normál rehidratáló oldat, többlépéses fókuszálás

**10. táblázat: A cigája és a szapora merinó között expressziós különbséget mutató, tömegspektrométerrel azonosított spotok átlag V% (intenzitás) és szórás értékei**

Spot	Fajta	Átlag	Szórás	Szignifikancia szint (P)
250	cigája	0,095	0,0501	0,006
	merinó	0,188	0,0066	
264	cigája	0,023	0,0090	0,040
	merinó	0,061	0,0375	
293	cigája	0,119	0,0574	0,042
	merinó	0,044	0,0253	
405	cigája	0,030	0,0139	0,038
	merinó	0,011	0,0065	
563	cigája	0,027	0,0122	0,000
	merinó	0,175	0,0462	
587	cigája	0,258	0,0977	0,033
	merinó	0,402	0,0665	
766	cigája	0,436	0,1086	0,028
	merinó	0,226	0,1417	
767	cigája	0,183	0,0343	0,050
	merinó	0,250	0,0582	
798	cigája	0,439	0,0361	0,005
	merinó	0,308	0,0725	
886	cigája	0,036	0,0161	0,03
	merinó	0,094	0,0509	
988	cigája	0,047	0,0249	0,026
	merinó	0,111	0,0492	
1024	cigája	0,818	0,1791	0,039
	merinó	1,080	0,1371	
1176	cigája	0,094	0,0609	0,007
	merinó	0,221	0,0410	
1208	cigája	0,113	0,0504	0,05
	merinó	0,054	0,0077	

### Struktúrfehérjék

A struktúrfehérjék a sejtekben nagy gyakorisággal fordulnak elő. Szerepet játszanak a sejtek belső vázának, a citoskeletonnak a létrehozásában, ezáltal a sejtek alakjának kialakításában, a belső transzportfolyamatok kivitelezésében, jelátviteli folyamatokban és a sejtsztódásban is kulcsfontosságúak (SMALL és mtsai, 1999). A struktúrfehérjék másik nagy csoportja az izommozgás kivitelezésében vesz részt. Ezek a miofibrilláris fehérjék, melyek közé az aktin, miozin, tropomiozin, troponin, titin és az alfa-, béta-aktinin sorolható (COOPER, 2000). Harmadik csoportjuk a kötőszövetekben expresszáldó struktúrfehérjék, melyek a szövetek fő tömegét alkotják, ide tartozik a kollagén, elasztin és a retikulin (GALLOP és mtsai, 1972). Az általunk azonosított fehérjék közül, több is a struktúrfehérjék családjába tartozik.

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

Spot	Azonosított fehérjék	Uniprot azonosító	Azonosított peptidok száma/% szekvencia lefedettség <sup>1</sup>	Elméleti pI/Mw <sup>2</sup> (Da)	Arány <sup>3</sup>
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-phosphofruktokinase, 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	B9VVGZ8 (Ovis aries)	3/27	4,9/19.102	2,3
1208	Myoglobin	P02190 (Ovis aries)	5/45	6,9/16.923	0,5

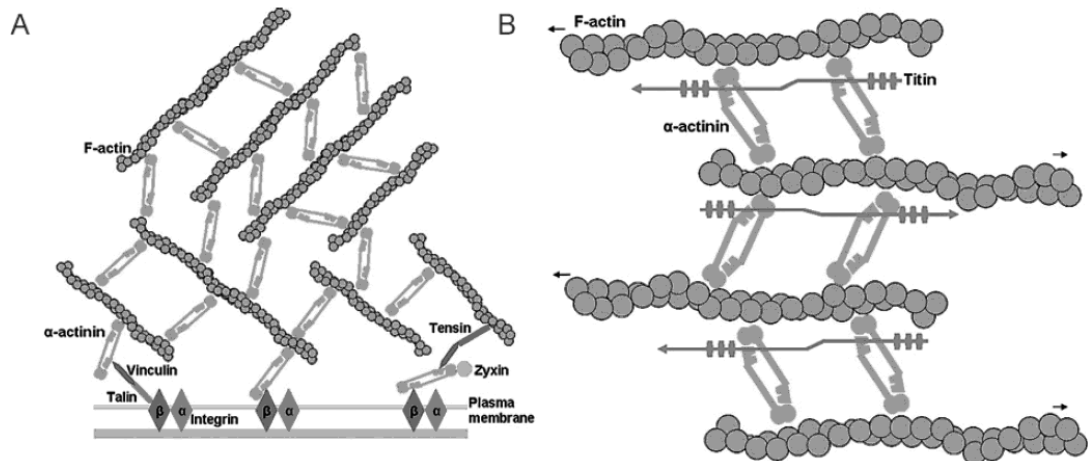
<sup>1</sup> Hány db peptidet azonosítottak a fehérjéből, és ezek hány százalékát fedik le a teljes szekvenciának

<sup>2</sup> Swissprot adatbázisban szereplő izoelektromos pont és molekulásúly értékek

<sup>3</sup> Cigája csoporthoz viszonyított arány a V% értékek alapján

Az alfa aktinin-3 (250-es spot) egy aktin-kötő fehérje, mely a nagymértékben konzervált spektrin szupercsaládba tartozik (BLANCHARD és mtsai, 1989). Fontos szerkezeti és szabályozó szerepet játszik mind a citoszkeleton kialakításában, mind az izomösszehúzásban. A citoszkeletonban az aktin szálakat egymáshoz, illetve a membránhoz kapcsolódó struktúrákhoz (pl.:vinkulin, tenzin) kapcsolja. A harántcsíkolt izomsejtekben a szarkomérák Z-vonalában helyezkedik el, és specifikus aktinkötőhelyekkel rendelkezik, így a szarkomérák integritásának fenntartásában is kulcsfontosságú (AGARKOVA és mtsai, 2003). Tulajdonképpen mindkét esetben, a citoszkeletonban és a harántcsíkolt izmokban is, aktin-kereszt-kötőként működik (17. ábra) (SJÖBLOM és mtsai, 2008; VINCENT és mtsai, 2010). Emberi szöveteken és egér modelleken végzett kísérletek során megállapították, hogy alfa-actinin-3 hiányában

csökken az izomtömeg, az izomerő és a gyors izomrostok keresztmetszetének területe (VINCENT és mtsai, 2007; MACARTHUR és mtsai, 2008; CHAN és mtsai, 2008). Vizsgálatunkban a 250-es spotban azonosított alfa aktinin-3 kétszer nagyobb expressziós szintet mutatott a szapora merinó fajtában a cigájához viszonyítva.



**17. ábra: Az alfa-aktinin**

A: Citoszkeleton B: Szarkomer (Forrás: SJÖBLOM és mtsai, 2008)

A 767-es foltban található fehérjét szarvasmarha alfa-aktinként azonosítottuk, mely a szívizomban expresszálódik. Ez a szarvasmarha alfa-aktin 99%-os szekvencia homológiát mutat a juh béta-aktin fehérjével, mely a citoplazmában expresszálódik. A 886-os spotban azonosított fehérje szintén a citoplazmában jelen lévő béta-aktin. Az aktin fehérjének három fő izoformája létezik: alfa, béta és gamma aktin. Az alfa aktin az izomsejtekben található és az izomösszehúzásban vesz részt, ezzel szemben a béta és a gamma izoforma a citoszkeleton alkotóeleme. A béta-aktin a legtöbb sejttípusnál a sejten belüli mozgásokban játszik közvetítő szerepet (NAKAJIMA-IIJIMA és mtsai, 1985). Mindkét spotban a szapora merinó esetén azonosítottunk magasabb expressziós szintet, ez a 767-es folt esetén 1,4-szeres, míg a 886-os folt esetén 2,6-szoros volt.

Az izomműködés molekuláris mechanizmusában az aktin mellett a másik meghatározó fehérje a miozin. Egy miozin molekula 2 nehéz és 4 könnyű láncból áll, 2-2 könnyű lánc kapcsolódik 1-1 nehéz lánchoz a nyaki régióban. A könnyű láncok a kalmodulin szupercsaládba tartoznak, két csoportba sorolhatók: az egyik a nem-foszforilált vagy esszenciális könnyű láncok (alkilált), a másik pedig a foszforilált vagy más néven szabályozó könnyű láncok csoportja.

A 988-as és az 1024-es spotban is a miozin könnyű lánc 1/3 fehérje (MLC1/MLC3), vázizom izoformáját azonosítottuk. Egyetlen genetikai lókuszt kódolja az MLC1 és az MLC3 fehérjét a vázizomban. Ezek a fehérjék a nem-foszforilált könnyű láncok közé tartoznak, nem kötnek kalciumot (PERIASAMY és mtsai, 1984). A miozin motor doménjének szabályozását végzik, az aktin kötés és az ATP hidrolízis folyamatában (TRYBUS, 1994). Mindkét spotban a szapora merinóban detektáltunk magasabb expressziós szintet, a 988-as esetén 2,3-szoros, az 1024-es esetén 1,3-szoros volt a különbség.

Egy további spotban (1176) a miozin könnyű láncok másik csoportjába tartozó miozin könnyű lánc 2 fehérjét azonosítottunk. Ezt a fehérjét az izomösszehúzóds során a  $Ca^{2+}$ /kalmodulin függő miozin könnyű lánc kináz foszforilálja (SWEENEY, 1993). A foszforiláció fokozódásával az izomösszehúzóds is fokozódik, mivel nő a miozin ATP-áz aktivitása. Patkányokon és egereken végzett kísérletek során megállapították, hogy ez a fehérje csak a vázizomban expresszálódik, mind az újszülött, mind a kifejlett állatok esetén (EINAT és mtsai, 1987). Fajta összehasonlító vizsgálatunk során 2,3-szor nagyobb expressziót detektáltunk a szapora merinóban a cigájához képest.

#### Szénhidrát metabolizmushoz köthető fehérjék

A két csoport között expressziós különbséget mutató fehérjék közül, hat olyat azonosítottunk, melyek a szénhidrát metabolizmusban játszanak szerepet. A szénhidrátokat energia raktárként, illetve közvetlen energia forrásként is használja a szervezet. A lebontásuk során keletkezett közti termékek más anyagok szintézisében játszanak fontos szerepet. A glükóz a szénhidrát metabolizmus központi eleme, lebontása a glikolízis folyamata során megy végbe a citoplazmában, majd a mitokondriumban folytatódik a citromsavciklusban és a terminális oxidációban. A teljes lebontó folyamatban számos enzim részt vesz, melyek az egyes köztitermékek egymásba alakulását katalizálják. A szénhidrátok lebontásának folyamata azért is kulcsfontosságú, mert a többi szerves anyag lebontása is ebbe az útvonalba torkollik bele (BOITEUX és HESS, 1981; HERS 1983; MUIRHEAD és WATSON, 1992).

A 264-es foltban azonosított akonitát hidratáz (akonitáz) egy mitokondriumban lokalizálódó enzim, mely a citromsavciklusban a citrát-izocitrát átalakulást katalizálja, a

cisz-akonitát köztiterméken keresztül (KOEN és GOODMAN, 1969). Az enzim tartalmaz egy vas-kén központot, így részt vesz a vas metabolizmusban is, mivel szabályozza a  $\text{Fe}^{2+}$  raktározását (MATASOVA és POPOVA, 2008). Ez a fehérje 2,6-szor nagyobb mennyiségben expresszáldott a merinó csoportban.

Az izomspecifikus 6-foszfófruktokináz enzimet azonosítottuk a 293-as spotban, mely a glikolízis harmadik lépésében a fruktóz 6-foszfát - fruktóz 1,6-biszfoszfát átalakulást katalizálja, ATP felhasználásával. Ez az enzim a legfontosabb szabályozási pont a glikolízisben, hiszen aktivitása függ a sejtben lévő ATP/AMP aránytól. Ennek megfelelően az izomsejtek képesek szabályozni a glikolízis mértékét a sejtek energiaszükségleteinek megfelelően (WEGENER és KRAUSE, 2002). Ennél a fehérjénél 2,7-szeres expressziós különbség volt megfigyelhető a cigája csoportban a merinóhoz képest.

A 405-ös foltban a béta-enoláz izom-specifikus fehérjét azonosítottuk, mely csak a harántcsíktolt izmokban expresszáldik (CHEN és mtsai, 1976). 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 posztnatális fejlődése, növekedése során, ennek az az oka, hogy az energia metabolizmusban vesz részt, konkrétan a piruvát termelésben (PICARD és mtsai, 2010). A béta-enoláz 2,7-szer nagyobb expressziót mutatott a cigája egyedekben a szapora merinóhoz képest.

A mitokondrium membránjában található ATP-szintáz működése során az ADP-ből ATP-t szintetizál, ez a szintézis a membrán két oldala között fenálló protonkülönbség kiegyenlítődése során megy végbe. A protonkülönbség a terminális oxidáció elektrontranszportja során alakul ki. A terminális oxidáció tulajdonképpen a szénhidrát lebontás utolsó lépcsőfokának tekinthető, ebben a szakaszban a legjelentősebb az ATP termelés. A mitokondriumban található F-típusú ATP-ázok két részből épülnek fel, az  $F_1$  domén a belső membrán külső oldalán helyezkedik el (mitokondrium belseje felé néz) és a katalitikus központot tartalmazza, az  $F_0$  pedig a protoncsatorna szerepét tölti be a membránban. Az 563-as spotban azonosított ATP-szintáz béta alegysége az  $F_1$  doménban található és a katalitikus központ kialakításában vesz részt (WALKER és mtsai, 1982; AMZEL és mtsai, 2003). Az ATP-szintáz béta-alegység fehérje 6,5-szörös

expressziós szint emelkedést mutatott a szapora merinó egyedek hosszú hátizom szövetében.

A 766-os spotban expresszálódott gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz egy esszenciális „háztartási” enzim, mely a glikolízis második szakaszában a gliceraldehid 3-foszfát – glicerinsav-1,3-biszfoszfáttá történő alakulását katalizálja. Ebben a második fázisban keletkeznek a nagy energiatartalmú molekulák (ATP, NADPH). Az enzim, a glikolízisben betöltött szerepén kívül, egyéb funkcióval is rendelkezik (MICHAEL, 1998). Szerepet játszik a membrán fúzióban, a mikrotubulusok kialakításában, foszfortranszferáz aktivitása is ismert, a magi RNS exportban, a DNS replikációban és a DNS javítási mechanizmusokban is részt vesz (SIROVER, 1999). A gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz enzim expressziója a cigájában kétszer nagyobb volt a szapora merinóhoz képest.

A 798-as spotban azonosított fruktóz 1,6-biszfoszfátáz a fruktóz-1,6-biszfoszfát - fruktóz-6-foszfát átalakulást katalizálja a glükoneogenezis során. A glikolízisben a foszfofruktokináz katalizálja ezt a reakciót, mely mindkét irányban lejátszódik, de a glükoneogenezisben csak egyirányú folyamat (MARCUS és mtsai, 1986). A fruktóz-2,6-biszfoszfát képes szabályozni az enzim működését, mivel alloszterikusan gátolja a fruktóz 1,6-biszfoszfátáz, a foszfofruktokináz pedig aktiválja (WU és mtsai, 2006). A 798-as spotban azonosított enzim expressziója 40%-kal volt magasabb a cigája fajtában a szapora merinóhoz képest.

### Egyéb fehérjék

Az 587-es spotban azonosított stressz-indukálta foszfoprotein feladata a molekuláris chaperonok, a Hsp70 és Hsp90, kapcsolódásának szervezése. Így tulajdonképpen co-chaperonként funkcionál, reverzibilisen kapcsolja egymáshoz a Hsp70 és Hsp90 hősokk fehérjéket és képes ezek aktivitását is módosítani (JOHNSON és mtsai, 1998). Ezek a hősokk fehérjék, a fehérjék feltekeredésében és a stressz elleni védekezésben játszanak szerepet (TAVARIA és mtsai, 1996). A szapora merinó fajta kétdimenziós poliakrilamid gélekpein 60%-kal nagyobb expressziót detektáltunk a cigájához képest.

Az 1208-as foltban azonosított fehérje a mioglobin volt, mely cigája kosoknál kétszeres expressziót mutatott a szapora merinóhoz viszonyítva. A fehérje biológiai funkciója az oxigén ideiglenes tárolása az izmokban. A mioglobin a globin fehérjék családjába tartozó globuláris fehérje, mely egy porfirin gyűrűt tartalmaz, aminek a közepén egy vas atom helyezkedik el. A  $\text{Fe}^{2+}$ -hoz kapcsolódik a hem csoport, egy hisztidin oldallánc és az oxigén vagy szén-monoxid molekula (ORDWAY és GARRY, 2004). A mioglobin oxidáltsági állapota befolyásolja a húsok színét. A friss húsban a mioglobin vas atomjához  $\text{O}_2$  kötődik, így a frissen vágott hús metszéspapján cseresznye-piros színt láthatunk, a tárolás során azonban az oximioglobin ( $\text{Fe}^{2+}$ ) metmioglobinná ( $\text{Fe}^{3+}$ ) alakul, mely barna színű húst eredményez (MANCINI és HUNT, 2005).

A vizsgálatunkba bevont két fajta között a fehérjeszinten fellépő különbségek hátterében, a különböző mértékű és irányú szelekciós nyomás állhat. Ebből a szempontból a cigája egy ősbibb 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.

Mivel ismereteink szerint juhoknál nem végeztek még proteomikai fajtaösszehasonlító vizsgálatokat, így eredményeinket csak más fajokkal végzett kísérletek eredményeivel hasonlíthatjuk össze. D'ALESSANDRO és munkatársai (2011) két sertésfajtát hasonlítottak össze, ezek a casertana és nagy fehér fajták voltak. A két fajta közötti különbséget, az általunk végzett vizsgálathoz hasonlóan, a különböző

intenzitású szelekció jelentette. A casertana fajta nem volt kitéve nagy szelekciós nyomásnak, ellentétben a nagy fehérrel, melyet erőteljesen a hústermelés irányába nemesítettek. Számos struktúrfehérjét azonosítottak, melyek a nagy fehér fajtában mutattak magasabb expressziós szintet, köztük az általunk is detektált miozin könnyű láncokat és alfa aktin citoszkeletális fehérjéket is. KIM és munkatársai (2010) szintén két sertésfajta izom proteomját hasonlította össze, ők is egy őshonos, kevésbé nemesített koreai fajtát hasonlítottak a jó hústermelő, nagy szelekciós nyomásnak kitett landrace fajtához. Számos fehérje esetén találtak expressziós különbséget, de a struktúrfehérjék esetén nem tapasztaltak eltérést.

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 már korábban említett casertana és nagy fehér sertés fajták összehasonlítása során (D'ALESSANDRO és mtsai, 2011) is hasonló eredményre jutottak, ugyanis a kevésbé nemesített fajta esetén a glikolízis enzimeinek expressziós szintje megnövekedett, köztük az általunk is azonosított béta-enoláz és a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz enzimeké is. A glikolízishez kapcsolódó enzimek különböző mértékű expressziója az izmokban ill. húskban régóta vitatott téma (OHLENDIECK, 2010). Ez nagyrészt annak is köszönhető, hogy az izmokban természetes körülmények között nagy mennyiségben fordulnak elő, a citoszol tíz legnagyobb gyakoriságban előforduló enzimei közé tartoznak (MAUGHAN és mtsai, 2005). Leggyakrabban húsminőségi tulajdonságokkal hozzák összefüggésbe a glikolitikus enzimek expressziós változásait. SCHEFFLER és munkatársai (2007) például megfigyelték, hogy a megnövekedett glikolitikus-aktivitás nem jelent gyorsabb pH csökkenést az állatok vágását követően, mely folyamat a szélsőséges PSE húsminőség kialakításában közrejátszik. LAVILLE és kollégái (2007) sertéseken végzett vizsgálataik során megállapították, hogy a glikolitikus enzimek overexpressziója a porhanyóssággal pozitív korrelációt mutat. Konkrétan, az általunk is

azonosított gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz megnövekedett expressziója összefüggésbe hozható az intenzívebb apoptózissal, mely a húsok porhanyóságának kilakaitásában is részt vesz (CHUANG és mtsai, 2005). A húsminőséggel kapcsolatban még megemlíthetjük, hogy a mioglobin fehérje is a cigájában mutatott magasabb expressziót, igaz ez nem a szénhidrát metabolizmusban vesz részt, de ennek ellenére a hús színének kialakításában fontos tényező, és a vásárlók számára a szín az egyik meghatározó organoleptikus tulajdonság. A megnövekedett mioglobin expresszió hatására intenzívebb vörös hússzínt tapasztalhatunk (SEIDEMAN és mtsai, 1984).

A szakirodalomban eddig megjelent proteomikai fajtaösszehasonlító vizsgálatok többségében a stresszfehérjék expressziójában is találtak eltrérést. XU és kollégái (2009) valamint KIM és munkatársai (2010) is a nemesített fajtákban detektáltak magasabb stresszfehérje expressziót. A húsminőséggel kapcsolatos kutatások során megállapították, hogy a stresszfehérjék alacsony expressziója a porhanyósabb hússal és a magasabb intramuszkuláris zsírtartalommal vannak összefüggésben (BERNARD és mtsai, 2007; KIM és mtsai, 2008).

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 egy 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 az adott húsminőségi paramétereknek.

### **5. 3. Különböző elősúlyban levágott charolais bikák vázizom szövetének proteomikai vizsgálata**

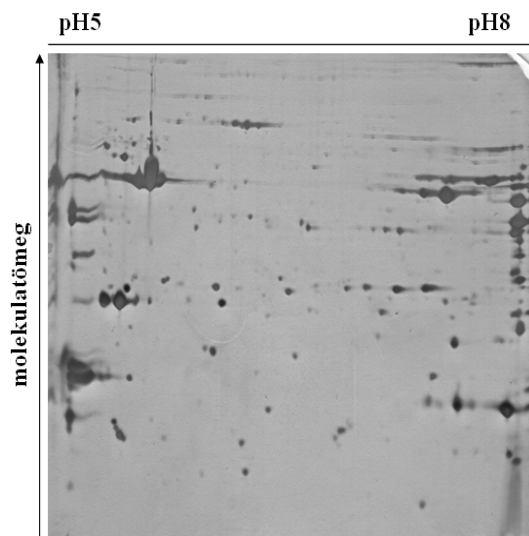
#### **5. 3. 1. Szarvasmarha vázizom kétdimenziós differenciáló gélelektroforézisének optimalizálási eredményei**

Vizsgálataink során igyekeztünk megtalálni az optimális paramétereket a szarvasmarha vázizom kétdimenziós differenciáló gélelektroforézise esetén, ehhez különböző beállításokat teszteltünk a lízis puffer, az alkalmazott pH tartomány és az izoelektromos fókuszálás kondíciói terén.

A kétdimenziós differenciáló gélelektroforézisnél figyelembe kellett vennünk, hogy a fehérjék izolálása során alkalmazott vegyszerek kompatibilisek legyenek a fluoreszcens festékekkel (Cy2, Cy3, Cy5). A CyDye DIGE Fluor Kit használati utasításában szerepel néhány ajánlás a lízis puffer összetételére vonatkozóan, de izomszövetre optimalizált nincs köztük. A szakirodalomban gazdasági állatok esetén csak néhány közleményben találkozunk a 2D-DIGE módszer használatával, speciálisan izomszövetre vonatkozóan pedig még kevesebb a témában megjelent publikációk száma. HOLLUNG és munkatársai (2009) sertések vizsgálata során használta ezt a módszert, de az általuk alkalmazott lízis puffer összetétele (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,25 mM szacharóz) teljesen különbözik a CyDye DIGE Fluor Kit használati utasításában szereplő puffer összetételtől. OE és munkatársai (2011) szarvasmarha fajnál használták a 2D-DIGE módszert a musculus masseter és semitendinosus szövetek esetén, az általuk használt lízis puffer összetétele: 8M urea, 30mM Tris, 4% CHAPS volt.

Kiválasztottunk egy általános lízis puffert a gyártó ajánlásai közül (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris), illetve ezt a puffert kiegészítettük alacsony koncentrációban alkalmazott DTT-vel (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris, 10 mM DTT), valamint teszteltük az OE és munkatársai (2011) által használt 8 M urea, 30 mM Tris, 4% CHAPS összetételű lízis puffert is. A thioureát nem tartalmazó puffer esetén detektáltuk a legkevesebb fehérje spotot a géleken (átlag: 260, szórás: 55). Ennek az az oka, hogy az izomszövet nagy arányban tartalmaz nehezen oldható fehérjéket és thiourea nélkül ezeket nem tudjuk oldatba vinni, így nem jelennek meg a

kétdimenziós mintázatban. A DTT tartalmú puffer sem bizonyult megfelelő hatékonyságúnak (átlag: 280, szórás: 32 fehérjefolt). Azért teszteltünk DTT tartalmú puffert is, mert korábbi vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a DTT növeli a fehérjék izolálásának hatékonyságát. Annak ellenére, hogy a fluoreszcens festék leírásában szerepel, hogy 0,2 m/V%-ban alkalmazott DTT kis mértékben csökkenti a festés hatékonyságát, megállapítottuk, hogy már a 0,15 m/V%-ban használt DTT nagymértékű hatékonyság csökkenést okoz (18. ábra).



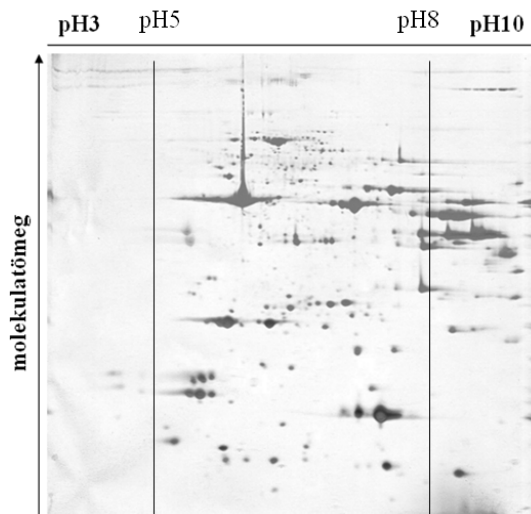
**18. ábra: Szarvasmarha vázizom 2D-DIGE képe a DTT tartalmú puffer alkalmazásával**

7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris, 10 mM DTT (lízis puffer), többlépéses fókuszálás

A fentebb leírtak alapján megállapítható, hogy a 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris tartalmú lízis puffer bizonyult a leghatékonyabbnak (átlag: 350, szórás: 26 fehérjefolt) a szarvasmarha hosszú hátizom fehérjéinek 2D-DIGE módszerrel történő elválasztása során.

A fehérjék első dimenziós izoelektromos fókuszálását pH 3-10 és pH 5-8-as tartományban is elvégeztük. Az 19. ábrán látható, hogy a pH 3-5 tartományban elhanyagolható a detektálható fehérjék száma, a pH 8-10-es sávban ugyan több fehérje is látható, de ez a régió a bázikus csíkozottság miatt (a 19. ábrán is látható) az elemzés során mindig nehezen értelmezhető, ezért érdekesebb ezt a régiót is elhagyni és inkább a középső (pH 5-8) tartomány felbontását növelni. Ezek alapján a két csoport közötti

különbségek azonosításához a későbbiekben a pH 5-8-as tartományú IPG stripeket használtuk.

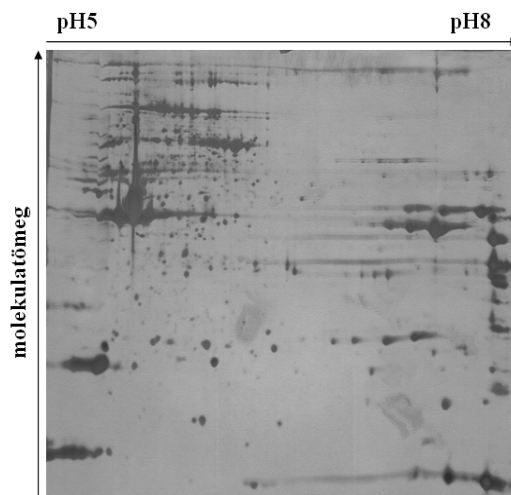


**19. ábra: Szarvasmarha vázizom 2D-DIGE képe pH 3-10-es tartományban**

7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris (lízis puffer), többlépéses fókuszálás

Ahogy már az előző két vizsgálat során, úgy itt is az izoelektromos fókuszálásnál kétféle beállítást teszteltünk. Az egylépéses fókuszálással itt sem nem értük el a kívánt eredményt. A 20. ábrán látható, hogy számos vízszintes csík megjelent a gélképen, illetve a nagyobb molekulatömegű régióban, pH 5-6 tartományban a fehérjék felhalmozódtak, nem váltak el az izoelektromos pontjuknak megfelelően. Ezeknek a jelenségeknek a hátterében a nem megfelelő izoelektromos fókuszálás áll. A többlépéses fókuszálás során az első lépésben egy alacsony feszültség értéket használtunk és csak ezután kezdtük növelni a feszültséget. Valószínűleg ez a kezdeti alacsony feszültség segít a fehérjéknek, hogy megkezdjék vándorlásukat a gélben. Ez alapján a választottuk a többlépéses fókuszálást a további futtatásokhoz.

Az optimalizálás során kiválasztott ideális paraméterek összefoglalása az 12. táblázatban látható.



**20. ábra: Szarvasmarha vázizom 2D-DIGE képe egylépéses izoelektromos fókuszálás alkalmazásával**

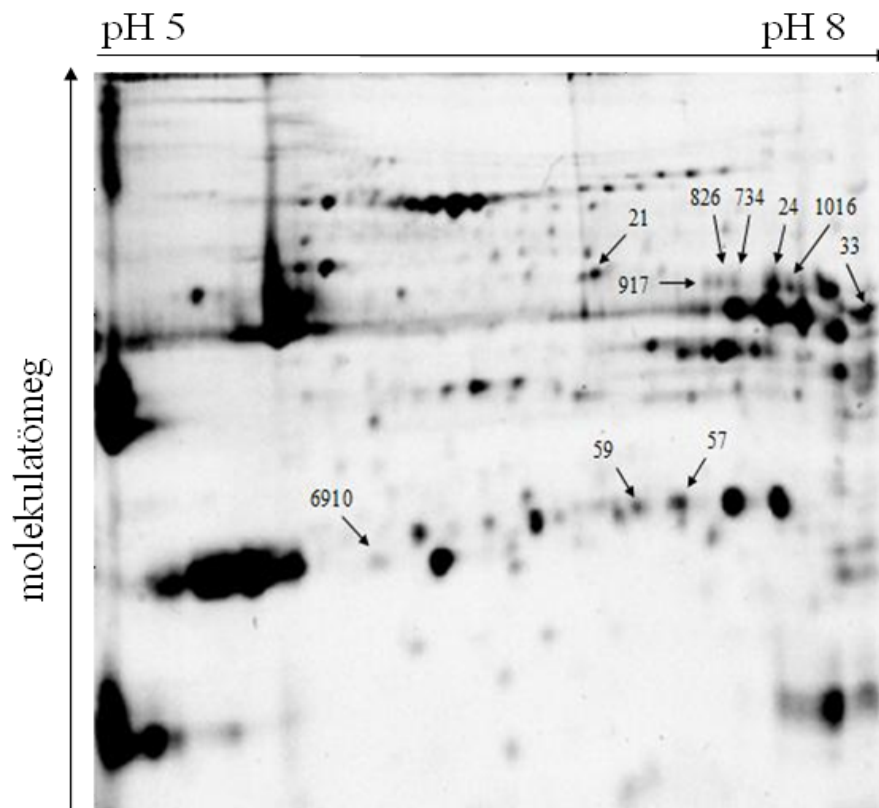
7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris (lízis puffer)

**12. táblázat: Szarvasmarha vázizom proteomjának kétdimenziós differenciálógélelektroforézise során alkalmazott ideális paraméterek összefoglalása**

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

### 5. 3. 2. Az 500 és 700 kg-os élősúlyban levágott charolais bikák vázizom proteomjának összehasonlítása során kapott eredmények

Munkánk során 10 charolais bikát vontunk be az összehasonlító proteomikai vizsgálatba, melyek közül 5 állatot átlagosan 500 kg-os élősúlyban, míg a másik 5 állatot átlagosan 700 kg-os élősúlyban vágta le. A mintavétel a vágás során történt a musculus longissimus dorsi szövetből. Ezekből a húsmintákból izoláltuk a fehérjéket, melyeket fluoreszcens festékekkel jelöltünk, a fehérjék elválasztását kétdimenziós differenciáló gélelektroforézissel (2D-DIGE) végeztük. Megközelítőleg 362 fehérje spotot (szórás  $\pm$  33) detektáltunk mindegyik gélen, melyek a 10-50 kDa közötti molakulatömeg és 5-8-as pH tartományban helyezkedtek el. A gélképek szoftveres elemzését a Delta2D program segítségével végeztük. Tíz fehérje spot expressziójában találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között ( $P < 0.05$ ). 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. Az expressziós különbséget mutató fehérjék azonosítása LC-MS/MS módszerrel történt.

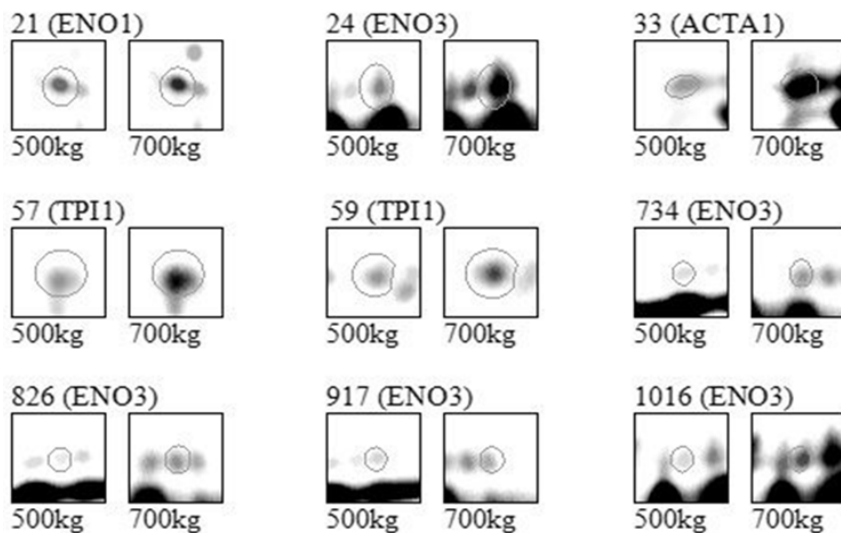


21. ábra: Szarvasmarha *musculus longissimus dorsi* 2D PAGE gélképe, az 500 és 700 kg-os csoport között expressziós különbséget mutató fehérjék jelölve

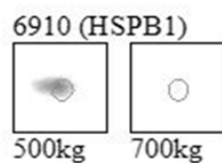
**13. táblázat: Az 500 és 700 kg-os csoport a között expressziós különbséget mutató spotok átlag V% (intenzitás) és szórás értékei**

Spot	Csoport	Átlag	Szórás	Szignifikancia szint (P)
21	500 kg	84,158	7,95	0,000
	700 kg	113,404	7,62	
24	500 kg	73,551	8,44	0,000
	700 kg	139,715	14,12	
33	500 kg	75,844	7,01	0,001
	700 kg	121,715	17,16	
57	500 kg	71,695	4,19	0,000
	700 kg	122,596	7,21	
59	500 kg	62,362	3,01	0,000
	700 kg	110,776	9,91	
734	500 kg	60,627	5,57	0,000
	700 kg	133,547	18,09	
826	500 kg	57,065	9,53	0,000
	700 kg	131,334	25,21	
917	500 kg	53,225	11,09	0,000
	700 kg	119,410	15,15	
1016	500 kg	75,164	10,76	0,001
	700 kg	134,302	22,69	
6910	500 kg	89,401	18,66	0,001
	700 kg	37,514	7,05	

Magasabb expressziós szint a 700 kg-os csoportban



Magasabb expressziós szint az 500 kg-os csoportban



**22. ábra: Az 500 és 700 kg-os csoport között expressziós különbséget mutató spotok**

**14. 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 <sup>1</sup>	Elméleti pI/Mw (Da) <sup>2</sup>	Arány <sup>3</sup>
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

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

<sup>2</sup> Swissprot adatbázisban szereplő értékek

<sup>3</sup> 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. Az Uniprot fehérje adatbázisban szarvasmarha faj esetén a béta-enoláz fehérje módosításait még nem közöltek, így nem tudjuk pontosan megmondani, hogy melyik típusú módosításról van szó. A magasabbrendű gerincesekben az aktív enoláz enzim egy fehérje dimer, mely három különböző alegység (alfa, béta, gamma) párosodásából jöhet létre. Ezeket az alegységeket külön gének kódolják, melyek expressziója szövetspecifikus és fejlődés specifikus módon is szabályozott. Az alegységek párosodásának függvényében az enolázoknak három izoformája ismert, az alfa, a béta és a gamma. Az alfa-enoláz sokféle szövetben expresszálódhat, a gamma-enoláz csak az idegrendszeri sejtekben jelenik meg, a béta-enoláz pedig egy izom-specifikus fehérje, mely a harántcsíkolt izmokban expresszálódik (CHEN és mtsai, 1976). 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 növekedés során az izomtömeg növekszik, mely nem az izomrostok számának növekedését jelenti, hanem maguknak a rostoknak a mérete nő meg (TE PAS és mtsai, 2004). Az izomrostok keresztmetszetének növekedése születéstől 24 hónapos korig közel lineáris, de a számuk a születést követő fejlődés során nem változik (WEGNER és mtsai, 2000). Ezek a tények megerősítik eredményeinket a béta-enoláz expresszióját illetően, hiszen a 700 kg-os csoport egyedeinél 1,8-2,2-szer nagyobb expressziót detektáltunk, mint az 500 kg-os állatoknál. DOHERTY és munkatársai (2004) is hasonló eredményeket kaptak broiler csirkék esetén, illetve HOLLUNG és kollégái (2009) sertéseknél jutottak ugyanerre az eredményre. Tehát több faj esetén is megállapították, hogy a béta-enoláz a hizlalási időszak alatt 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). A vázizmokban az ontogenezis során tulajdonképpen az  $\alpha\alpha$  izoformák alakulnak át  $\beta\beta$  izoformákká (KELLER és mtsai, 1994). Az alfa-enolázok is ugyanúgy a 2-foszfogllicerát - foszfoenolpiruvát konverziót katalizálják, mint a béta-enolázok. Több korábbi tanulmány szerint az alfa-enoláz szintje nem növekszik az életkor előrehaladtával. Egy immunhisztokémiai tanulmány bizonyította, hogy az alfa-enoláz jelenléte csak a lassú rostokra korlátozódott, melyek első generációs mioblasztokból származtak (PICARD és mtsai, 2010). Ellentétben a vázizomban tapasztaltakkal LEE és munkatársai (2002) kimutatták, hogy egerek szívizom szövetében a glikolitikus enzimek (beleértve az alfa-enolázt) növekvő expressziót mutatnak az életkor előrehaladtával.

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 700 kg-os csoportban az 500 kg-os csoporthoz képest. Az enzim fontos szerepet játszik az energiatermelésben (esszenciális „háztartási” enzim az élő sejtekben), 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 – MEKCHAY, 2009). Ez egy széleskörben vizsgált fehérje, melyet az életkor függő fehérjekárosodások akkumulációjának tanulmányozására használtak modellként (GRACY és mtsai, 1998). Számos életkorfüggő izoformáját azonosították már, melyek deamidálások és oxidációs folyamatok eredményeként jönnek létre (ZHANG és mtsai, 1995). Megállapítható tehát, hogy a triózfoszfát izomeráz fehérje expressziós változása valószínűleg kapcsolatba hozható az izomnövekedéssel. Ezt támasztja alá KEADY és munkatársai (2013) által végzett vizsgálat is, mely során megállapították, hogy szarvasmarhák esetén az intenzív izomnövekedéshez számos glikolitikus enzim overexpressziója társul. A fenti eredmények alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy a glikolitikus enzimek potenciális markerei lehetnek az izomnövekedésnek.

A glikolitikus enzimek kapcsán nem hagyhatjuk figyelmen kívül azt a több kutatás által igazolt összefüggést sem, miszerint a marhahúsok porhanyóssága és ezen fehérjék expressziója között korreláció figyelhető meg. Számos tanulmány számol be arról, hogy például az általunk is azonosított alfa- és béta-enoláz vagy a triózfoszfát izomeráz megnövekedett expressziója a porhanyósabb húsokban volt megfigyelhető (ZAPATA és mtsai, 2009; D’ALESSANDRO és mtsai, 2012; ZHAO és mtsai, 2014).

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. Az aktinok nagyon konzervált fehérjék, melyek részt vesznek a sejtek motilitásának, struktúrájának és integritásának kialakításában. 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 iomrostok 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. Ez a jelenség valószínűleg a Hsp fehérjék anti-apoptotikus tulajdonságán alapul, mely a vágást követő izom-hús átalakulásban fontos tényező (OUALI és mtsai, 2006). A porhanyósságon kívül egyéb húsminőségi tulajdonsággal is összefüggésbe hozható a Hsp27 fehérje szintje, JOSEPH és munkatársai (2012) megállapították, hogy a marhahús színének stabilitása pozitív korrelációt mutat a Hsp27 expressziójával. Ez a jelenség a Hsp27 fehérje chaperon aktivitásával és anti-apoptotikus funkciójával magyarázható, mivel a miofibrilláris valamint a mioglobinnal fehérjék aggregációjának és denaturálódásának akadályozásán keresztül hozzájárul a hús színének stabilitásához. KIM és kollégái (2008) egy vizsgálatuk során megállapították, hogy a magasabb Hsp27 expressziós szint a gyengébb minőségű marhahúshoz köthető, mely kevésbé porhanyós, inkább rágós. BERNARD és munkatársai (2007) a Hsp40 fehérjét kódoló gén overexpresszióját detektálták a kevésbé porhanyós húsban, tehát negatív korrelációt feltételeztek a Hsp40 fehérje és a porhanyósság között. MORZEL és kollégái (2008) azonban arról számoltak be, hogy pozitív korrelációt találtak a Hsp27 fehérje expressziója és a porhanyósság között. Az egymásnak látszólag ellentmondó eredmények azzal magyarázhatók, hogy a Hsp27 fehérjének számos izoformája létezik, melyek különböző pozícióban lévő foltként jelennek meg a gélképeken, az izoformák döntő többsége valóban negatív korrelációban áll a porhanyóssággal, azonban néhányuk a porhanyósabb húsban expresszálódik nagyobb intenzitással, tehát pozitív korrelációt mutat a vizsgált tulajdonsággal (CHAZE és mtsai, 2013).

Az általunk azonosított expressziós változás és a porhanyósság kapcsolatáról nem vonhatunk le következtetést, hiszen a nyíróerő meghatározása nélkül nem állíthatjuk, hogy melyik csoport húsa porhanyósabb. Ugyan közismert az a tény, hogy a hús porhanyóssága függ a vágáskori életkortól (WEBB és mtsai, 1964), mivel az életkor előrehaladtával csökken a kollagén fehérjék oldhatósága (BOCCARD és mtsai, 1979,

WESTON és mtsai, 2002). Ez alapján feltételezhetnénk, hogy a 440 napos csoportba tartozó egyedek húsa porhanyósabb, de mivel a két csoport életkora között nincs nagy különbség, ezért ezt nem jelenthetjük ki. CHAZE és munkatársai (2013) egy nagyszabású vizsgálat során 981 azonos korú blond d'aquitaine (14 hónapos), 1254 azonos korú limuzin (16 hónapos) és 1114 azonos súlyú (730 kg) charolais bika húsminőségi tulajdonságait vizsgálta. Az egyes fajtákon belül hoztak létre porhanyós és kevésbé porhanyós húsú csoportokat a nyíróerő meghatározását követően, melyekből néhány állatot kiválasztottak a proteomikai elemzésre. Ők is megállapították, hogy a hősokk fehérjék expressziója a rágós húsokban magasabb (különösen a Hsp20 fehérje), viszont ebből a tanulmányból az is látható, hogy azonos korú vagy azonos súlyú állatok húsa között is nagy különbségek lehetnek porhanyósság szempontjából.

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 hízóbikák 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 azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a proteomikai módszerek alkalmasak komplex tulajdonságok vizsgálatára. Ugyan az állattenyésztésben még korlátozott a felhasználásuk, de az ismeretanyag növekedésével és a műszeres technikák fejlődésével párhuzamosan, egyre nagyobb igény mutatkozik a termelési, fiziológiai és patofiziológiai jelenségek mélyebb megértésére.

## 6. 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 differenciáló 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 pH 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 acetyl-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 citoskeletális 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 juhajtók 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-indukált 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 hízóbikák 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 hősokk fehérje esetén detektáltunk magasabb expressziós szintet.

## **7. 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.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

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.

A proteomika alkalmazása ezidáig 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, sejtorganellumok, 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 mutatkozó nagymértékű variabilitás megnehezíti az optimális mintatisztítási, frakcionálási és elválasztási módszerek kiválasztását.

Munkánk során szarvasmarha, juh és házityúk izom-, illetve májszövetének proteomikai vizsgálatát végeztünk el különböző kezelések mellett. A munka fontosabb lépéseit és eredményeit az alábbiakban foglaltuk össze.

A házityúk máj proteomjában szelén indukció hatására bekövetkező változások azonosításához 12 kísérleti állatból két vizsgálati csoportot hoztunk létre, a kontroll csoport (6 egyed) takarmánykeverékében 0,2 mg/kg, míg a kísérleti csoport (6 egyed) takarmányában 4,25 mg/kg volt a Se-koncentrációja. Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézist használtunk a máj fehérjéinek elválasztására, a nagyobb hatékonyság érdekében az elválasztás bizonyos paramétereit csirkemáj szövetre optimalizáltuk (fehérje izolálás, pH tartomány, fehérjemennyiség, rehidratáló puffer összetétele, izoelektromos fókuszálás kondíciói, poliakrilamid gél koncentrációja, festés módja). A gélelektroforézis során készült gélképek mintázatát Delta2D gélelemző szoftver segítségével hasonlítottuk össze, a két csoport között expressziós különbséget mutató fehérjék azonosítása folyadék kromatográfiával kapcsolt tömegspektrométerrel történt.

Az elemzést követően megállapítottuk, hogy 8 fehérje a kezelt csoportban mutatott magasabb expressziós szintet: alfa-aminoadipic semialdehid dehidrogenáz, citoplazmatikus aktin, proteaszóma alfa típusú alegység fehérje, ADF aktin kötő fehérje, peroxiredoxin 6, citoplazmatikus malát dehidrogenáz, alfa-enoláz, 3-merkaptopiruvát szulfurtranszferáz. Míg másik 5 fehérje expressziója lecsökkent a szelénrel kezelt csoportban: foszfoenolpiruvát karboxikináz, glicerol-3-foszfát-dehidrogenáz, RNS kötő fehérje 8A, eukarióta translációs iniciáció faktor 5A-1, acetyl-koenzim A dehidrogenáz. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az alkalmazott szelén dózis csökkentette a glükoneogenezis intenzitását, megnövelte a citoskeletális aktin mennyiségét és ezzel együtt az aktin szabályozását végző fehérje expresszióját is. A kezelés a zsírsavak metabolizmusát is befolyásolhatta, az azonosított fehérjék funkciója alapján feltételezhetjük, hogy csökkent a zsírsav szintézis és a lebontás is. Mindezek mellett az antioxidáns rendszerre is hatással volt a szelén, hiszen a kezelt csoportban három olyan enzim expressziója is megnövekedett, melyek az antioxidáns folyamatokban játszanak szerepet.

A különböző genotípusú növendék kosok hosszú hátizom szövetének proteomikai elemzéséhez 10 állatot vontunk be a vizsgálatba, ebből 4 egyed szapora merinó és 6 egyed cigája volt. Ahogy az előző vizsgálatban, úgy itt is kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézist használtunk a fehérjék elválasztására, ehhez kiválasztottuk az ideális lízis puffert, pH tartományt, rehidratáló puffert és az izoelektromos fókuszálás kondícióit. A géleképek elemzését Delta2D szoftver segítségével végeztük, a két csoport között expressziós különbséget mutató fehérjék azonosítása folyadék kromatográfiával kapcsolt tömegspektrométerrel történt.

Az azonosított fehérjék közül 7, a szapora merinóban mutatott magasabb expressziót, ezek a miozin könnyű lánc 1/3 és miozin könnyű lánc 2 fehérjék, az alfa-aktinin, a béta-aktin, az akonitát hidratáz, az ATP szintáz béta-alegység fehérje és a stressz-indukálta foszfoprotein. Míg másik 5 fehérje a cigájában expresszáldott nagyobb mértékben, ezek a 6-foszfofruktokináz, a béta-enoláz, a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz, a fruktóz 1,6-biszfoszfátáz és a mioglobin fehérjék. Az azonosított fehérjéket funkciójuk alapján három csoportba soroltuk: struktúrfehérjék, szénhidrát metabolizmushoz köthető fehérjék és egyéb feladatot ellátó fehérjék. A struktúrfehérjék mindegyike a merinó fajtában mutatott magasabb expressziót, ez a jelenség az intenzív fehérjebeépüléssel lehet összefüggésben. A szakirodalomban közölt fehérje markerek és

az általunk azonosított szénhidrát metabolizmushoz és egyéb feladatokhoz köthető 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. A jövőben érdemes lenne a szapora merinó és a cigája fajták műszeres húsminőségi vizsgálatát elvégezni és a vizsgálat eredményét összevetni az általunk azonosított fehérjék alapján levont következtetésekkel.

A különböző élősúlyban levágott charolais bikák vázizom szövetének proteomikai elemzéséhez 10 charolais bikát vontunk be a kísérletbe, 5 állatot átlagosan 500 kg-os élősúlyban 440 napos korban, míg 5 állatot átlagosan 700 kg-os élősúlyban, 540 napos korban vágunk le. Kétdimenziós differenciáló gélelektroforézist használtunk az izom fehérjéinek elválasztására. A gélelektroforézis hatékonyságának növelése érdekében optimalizáltuk a fehérje izoláláshoz használt puffer összetételét, az elválasztás során alkalmazott pH tartományt és az izoelektromos fókuszálás kondícióit. A két csoport gélképeinek fehérje mintázatát Delta2D gélelemző szoftver segítségével hasonlítottuk össze, a két csoport között expressziós különbséget mutató fehérjék azonosítása folyadék kromatográfiával kapcsolt tömegspektrométerrel történt.

Az alfa-enoláz, a béta-enoláz, a kontraktilis aktin és a triózfoszfát izomeráz fehérjék a 700 kg-os csoportban mutattak magasabb expressziós szintet, míg a Hsp27 hősokk fehérje expressziója az 500 kg-os csoportban volt magasabb. Eredményeinket összevettük az irodalomban található adatokkal, ezek alapján megállapítottuk, hogy a béta-enoláz fehérje több fajnál is bizonyítottan az idősebb állatokban mutat magasabb szintű expressziót, ezzel jelezve a nagyobb glikolitikus aktivitást. A 700 kg-os csoport nagyobb glikolitikus aktivitását a triózfoszfát izomeráz fehérje expressziós növekedése is jelzi, mely az izomnövekedéssel is kapcsolatba hozható. A kontraktilis aktin megemelkedett expressziója szintén az izomnövekedéssel mutat korrelációt. A Hsp27 fehérje 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. Az általunk vizsgált két csoport húsminőségi paramétereinek műszeres vizsgálata nélkül nem tudunk korrelációt vonni a Hsp27 ezen izoformája és a porhanyósság között.

Eredményeink 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 műszeres technikák fejlődésével párhuzamosan, egyre nagyobb igény mutatkozik a termelési, fiziológiai és patofiziológiai jelenségek mélyebb megértésére.

## 9. SUMMARY

In the last decades, molecular biology research became highlighted in animal production science, in particularly study of the macromolecules (DNA, RNA, proteins) those are the steps of genetic information flow.

The application of proteomics has already widespread in the fields of human medicine and pharmacological sciences. For the time being, proteomic methods are used in animal science, are related to physiological, immunological, reproduction biology, meat and milk production studies. The expression of cells, cell compartments, tissues and body fluids can be detected within the different treatments, making possible to understand the processes those are the results of the interactions of hundreds of proteins. Proteome analysis of different tissues of different livestock species is a huge challenge, because of variability of protein content that makes the decision difficult, which fractionation and separation method should be applied.

The objectives of the present study were to analyse proteome of muscle and liver tissues of cattle, sheep and chicken in different experiments. We summarize the main steps of the work and its results below.

In our experiment, we aimed to identify the changes of the proteome of chicken liver caused by selenium induction. 12 animals were included in the study, 6 of them were fed with control feed and 6 were fed as a treatment group. The selenium content of feed was 0.2 mg/kg in the control group (6 chicken) and 4.25 mg/kg in the experimental group (6 chicken). Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis was used to separate proteins of liver, for more effective biomarker search, we optimized some parameters for effective separation of the chicken liver tissue (extraction of proteins, pH range, amount of proteins, rehydration buffer, conditions of isoelectric focusing, concentration of polyacrylamide gel, staining method). Gel images were analyzed and compared with Delta2D software, spots which showed significant differences between groups, were identified with liquid chromatography coupled mass spectrometry (LC-MS/MS). Eight proteins showed a higher expression in experimental group: alpha-amino adipic semialdehyde dehydrogenase, cytoplasmic actin, proteasome subunit alpha type, ADF actin binding protein, peroxiredoxin 6, malate dehydrogenase cytoplasmic, alpha-enolase, 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase. In contrast the expression of other five proteins were reduced in the experimental group: phosphoenolpyruvate

carboxykinase, glycerol-3-phosphate dehydrogenase, RNA-binding protein 8A, eukaryotic translation initiation factor 5A-1, acyl-CoA dehydrogenase. Based on the results it can be concluded that the applied dose of selenium reduced the intensity of gluconeogenesis, increased the quantity of cytoskeletal actin and the expression of actin regulatory protein as well. The treatment could affect the metabolism of fatty acids, by the function of identified proteins we can suppose that fatty acid synthesis and degradation have reduced as well. Nevertheless, selenium has affected the antioxidant system, because the expression of three enzymes, which play a role in antioxidant process have increased in the experimental group.

A proteomic study was performed on *musculus longissimus dorsi* tissues of rams belong to two breeds. 10 rams were involved in the study, 4 of them were Merino and 6 of them were Tsigai. As in the previous study, two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis was used to separate individual proteins, thus we have chosen the appropriate lysis buffer, pH range, rehydration buffer, and the conditions of isoelectric focusing. Gel images were analyzed and compared with Delta2D software, spots which showed significant differences between groups, were identified with liquid chromatography coupled mass spectrometry (LC-MS/MS). Seven of the identified proteins have shown higher expression in Merino breed, these were myosin light chain 1/3 and myosin light chain 2 proteins, the alpha-actinin, the beta-actin, the aconitate hydratase, the ATP synthase subunit beta and stress-induced-phosphoprotein. While other 5 proteins overexpressed in Tsigai group, these were 6-phosphofructokinase, beta-enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, fructose-1,6-bisphosphatase and the myoglobin proteins. All of these proteins belong to three groups based on their functions, such as structural proteins, carbohydrate metabolism-related proteins, and miscellaneous proteins. All of the structure proteins have shown higher expression in the Merino breed, this can be in connection with intensive protein anabolism. After comparison of the protein markers in the literature and proteins identified by us which can be in connection with carbohydrate metabolism and other roles, we could conclude that Tsigai breed could have better meat quality parameters, because overexpression of glycolytic enzymes and myoglobin, and lower expression of stress-induced-protein would lead us to this conclusion. However we can not conclude this statement without information on meat quality parameters. In the future, it would be worth performing the

lab analysis of meat quality parameters of Merino and Tsigai breeds and compare the results to our conclusions that were made from identified proteins.

The aim of the study was to investigate the differences in the proteom patterns of musculus longissimus dorsi between Charolais bulls slaughtered at different liveweight. In a commercial beef cattle farm 10 finishing Charolais bulls were involved in the study, 5 of them were slaughtered at the live weight of 500 kg and at the age of 440 days old and 5 at 700 kg live weight, at 540 days old. Two dimensional - difference in gel electrophoresis was applied for the separation of proteins of muscle. Lysis buffer, pH range and the conditions of isoelectric focusing were optimized to increase efficiency of separation. The gel patterns of two groups was compared by Delta2D gel analyzing software, the spots which showed significant differences between the groups, were identified with liquid chromatography coupled mass spectrometry (LC-MS/MS). The alpha-enolase, the beta-enolase, the skeletal muscle actin and the triosephosphate isomerase proteins have shown higher expression rate in the 700 kg weight group, while up-regulation of heat shock protein beta-1 was observed in the 500 kg weight group. Comparing our results to the previously published data, it seems to be proven that beta-enolase protein shows higher expression level in older animals, indicating higher glycolytic activity. The higher glycolytic activity of the 700 kg group was indicated by the increased expression of triphosphate isomerase which could be linked to muscle growth. The up-regulation of contractile actin shows correlation with muscle growth as well. The change of heat shock protein beta-1 expression is connected with tenderness, stated by many papers. There are several isoforms of heat shock protein beta-1, the majority of them showed negative correlation with tenderness, nevertheless some of them had higher expression in more tender meat, so show positive correlation. Without beef quality analysis of bulls in the groups, we can not take a correlation between this isoform of heat shock protein beta-1 and tenderness.

In conclusion, the proteomic methods are appropriate to investigate complex traits. However their application in animal science is limited, but in parallel with growth of knowledge and development of state-of-art methods, there is an increasing demand for understanding the molecular background of animal production, physiological and pathophysiological traits of livestock species.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Agarkova I. - Ehler E. - Lange S. - Schoenauer R. - Perriard J. C. (2003): M-band: a safeguard for sarcomere stability? *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 24(2-3), 191-203.
2. Ahmed S. – Khosa A. N. (2010): An introduction to DNA technologies and their role in livestock production: a review. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 20. 305-314.
3. Aigner B. - Renner S. - Kessler B. - Klymiuk N. - Kurome M. - Wunsch A. (2010): Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *Journal of Molecular Medicine*, 88. 653–664.
4. Albertí P. - Panea B. - Sañudo C. - Olleta J. L. - Ripoll G. - Ertbjerg P. - Christensen M. - Gigli S. - Failla S. - Concetti S. - Hocquette J. F. - Jailler R. - Rudel S. - Renand G. - Nute G. R. - Richardson R. I. - Williams J. L. (2008): Live weight, body size and carcass characteristics of young bulls of fifteen European breeds. *Livestock Science*, 114. 19-30.
5. Albery W. J. - Knowles J. R. (1976): Free-energy profile for the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, 15. 5627-5631.
6. Amzel L. M. - Bianchet M. A. - Leyva J. A. (2003): Understanding ATP synthesis: structure and mechanism of the F1-ATPase (Review). *Molecular Membrane Biology*, 20(1). 27–33.
7. Andersen J. S. - Svensson B. - Roepstorff P. (1996): Electrospray ionization and matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: powerful analytical tools in recombinant protein chemistry. *National Biotechnology*, 14(4). 449-457.
8. Becker D. J. – Reul B. – Ozcelikay A. T. – Buchet J. P. – Henquin J. C. - Brichard S. M. (1996): Oral selenate improves glucose homeostasis and partly reverses abnormal expression of liver glycolytic and gluconeogenic enzymes in diabetic rats. *Diabetologia*, 39(1). 3-11.
9. Bendixen E. - Danielsen M. - Hollung K. - Gianazza E. - Miller I. (2010a): Farm animal proteomics-A review. *Journal of Proteomics*, 74. 282-293.

10. Bendixen E. - Danielsen M. - Larsen K. - Bendixen C. (2010b): Advances in porcine genomics and proteomics — a toolbox for developing the pig as a model organism for molecular biomedical research. *Briefings in Functional Genomics*, 9. 208–219.
11. Bendixen E. (2005): The use of proteomics in meat science. *Meat Science*, 71. 138–149.
12. 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.
13. Blanchard A. - Ohanian V. - Critchley D. (1989): The structure and function of alpha-actinin. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 10. 280–289.
14. Bocard R. L. - Naudé R. T. - Cronje D. E. - Smit M. C. - Venter H. J. - Rossouw E. J. (1979): The influence of age, sex and breed of cattle on their muscle characteristics. *Meat Science*, 3. 261-280.
15. Bodó I. – Domokos Z. – Zándoki R. (2003): A charolais fajta leírása, tulajdonságai, helye a világ szarvasmarha-tenyésztésében. In: A charolais fajta és magyarországi tenyésztése. Szerk.: Tózsér J., Mezőgazda kiadó, Budapest, 13-24.
16. Boiteux B. – Hess B. (1981): Design of glycolysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 293. 5–22.
17. Bouley J. – Chambon C. – Picard B. (2004): Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, 4(6). 1811–1824.
18. Brocker C. - Lassen N. - Estey T. - Pappa A. - Cantore M. - Orlova V. V. - Chavakis T. - Kavanagh K. L. – Oppermann U. – Vasiliou V. (2010): Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) is a novel enzyme involved in cellular defense against hyperosmotic stress. *Journal of Biological Chemistry*, 285. 18452-18463.
19. Bruns K. W. - Pritchard R. H. - Boggs D.L. (2004): The relationships among body weight, body composition, and intramuscular fat content in steers. *Journal of Animal Science*, 82. 1315–1322.
20. Burk R. F. - Hill K. E. (1993): Regulation of selenoproteins. *Annual Review Nutrition*, 13. 65-81.

21. Burley S. K. - Almo S. - Bonanno J. B. - Capel M. - Chance M. R. - Gaasterland T. - Lin D. - Sali A. - Studier F. W. - Seaminathan S. (1999): Structural genomics: beyond the human genome project. *Nature Genetics*, 23. 151–157.
22. Burton J. L. - Kehrlı Jr. M. E. (1995): Regulation of neutrophil adhesion molecules and shedding of *Staphylococcus aureus* in milk of cortisol- and dexamethasone-treated cows. *American Journal of Veterinary Research*, 56. 997–1006.
23. Cadenas E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry*, 58. 79–110.
24. Campbell A. M. - Heyer L. J. (2003): Genomika, proteomika, bioinformatika. Medicina kiadó, Budapest.
25. Candek-Potokar M. - Monin G. - Zlender B. (2002): Pork quality, processing, and sensory characteristics of dry-cured hams as influenced by Duroc crossing and sex. *Journal of Animal Science*, 80(4). 988-996.
26. Cantor A. H. - Scott M. L. - Noguchi T. (1975): Biological availability of selenium in feed stuffs and selenium compounds for prevention of exudative diathesis in chicks. *Journal of Nutrition*, 105. 96-105.
27. Carlier M. F. - Laurent V. - Santolini J. - Melki R. - Didry D. - Xia G. X. - Hong Y. - Chua N. H. - Pantaloni D. (1997): Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *Journal of Cell Biology*, 136(6). 1307-1322.
28. Celis J. E. - Kruhoffer M. - Gromova I. - Frederiksen C. - Ostergaard, M. - Thykjaer T. (2000): Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Letters*, 480. 2–16.
29. Chae H. Z. - Robison K. - Poole L. B. - Church G. - Storz G. - Rhee S. G. (1994): Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 91. 7017–7021.

30. Chan S. - Seto J. T. - MacArthur D. G. - Yang N. - North K. - Head S. (2008): A gene for speed: contractile properties of isolated whole EDL muscle from an  $\alpha$ -actinin-3 knockout mouse. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 295. 897-904.
31. Chapman, J. R. (2000): *Mass spectrometry of proteins and peptides*, Humana Press, Totowa, New Jersey.
32. Chaze T. - Hocquette J. F. - Meunier B. - Renand G. - Jurie C. - Chambon C. - Journaux L. - Rousset S. - Denoyelle C. - Lepetit J. Picard B. (2013): Biological markers for meat tenderness of the three main french beef breeds using 2-DE and MS approach. In: *Proteomics in Foods*, Szerk: Toldrá F., Nollet L. M. L., Springer, New York, 127-146.
33. Chen S. H. - Giblett E. R. (1976): Enolase human tissue distribution and evidence for three different loci. *Annals of Human Genetics*, 39. 277–280.
34. Choct M - Naylor A. J. - Reinke N. (2004): Selenium supplementation affects broiler growth performance, meat yield and feather coverage. *British Poultry Science*, 45(5). 677-683.
35. Chuang D. M. - Hough C. - Senatorov V. V. (2005): Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annual Review of Pharmacology Toxicology* 45. 269–290.
36. Clark L. C. - Combs G. F. - Turnbull B. W. - Slate E. H. - Chalker D. K. - Chow J. - Davis L. S. - Glover R. A. - Graham G. F. - Gross, E. G. - Krongrad A. - Leshner J. L. - Park K. - Sanders B. B. - Smith C. L. - Taylor R. (1996): Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. *Journal of the American Medical Association*, 276. 1957-1985.
37. Combs G. F. Jr. - Hady M. M. (1991): Selenium involved with vitamin E in preventing encephalomalacia in the chick. *FASEB Journal*, 5(4). 714.
38. Cooper G. M. (2000): *The Cell: A Molecular Approach*. Sinauer Associates; Sunderland.
39. Creighton T. E. (1997): *Protein structure – A practical approach*. Oxford University Press, USA.

40. Czauderna M. – Kowalczyk J. - Krajewska K. A. (2011): Influence of dietary selenium level on the concentration of conjugated linoleic acid isomers, other fatty acids and amino acids in the liver and femoral muscles of rats. *Czech Journal of Animal Sciences*, 56(2). 81–94.
41. D'Alessandro A. - Marrocco C. - Zolla V. - D'Andrea M. - Zolla L. (2011): Meat quality of the longissimus lumborum muscle of Casertana and Large White pigs: Metabolomics and proteomics intertwined. *Journal of Proteomics*, 75. 610-627.
42. D'Alessandro A. – Rinalducci S. – Marrocco C. – Zolla V. – Napolitano F. – Zolla L. (2012): Love me tender: An Omics window on the bovine meat tenderness network. *Journal of Proteomics*, 75 (14). 4360–4380.
43. Danielsen M – Codrea M. C. – Ingvarsten K. L. – Friggens N. C. - Bendixen E. - Rontved C. M. (2010): Quantitative milk proteomics — host responses to lipopolysaccharide-mediated inflammation of bovine mammary gland. *Proteomics*, 10. 2240–2249.
44. Danielsen M. - Hornshøj H. - Siggers R. H. - Jensen B. B. - van Kessel A. G. - Bendixen E. (2007): Effects of bacterial colonization on the porcine intestinal proteome. *Journal of Proteome Research*, 6. 2596–2604.
45. Danielsen M. - Thymann T. - Jensen B. B. - Jensen O. N. - Sangild P. T. - Bendixen E. (2006): Proteome profiles of mucosal immunoglobulin uptake in inflamed porcine gut. *Proteomics*, 6. 6588–6596.
46. de Almeida A. M. - Rui M. G. - Palhinhas T. K. - Scanlon T.- Greeff J. – Oldham C. – Milton J. – Coelho A. V. - Cardoso L. V. (2013): Muscle proteomics profiles in sheep: the effect of breed and nutritional status. In: *Farm animal proteomics*. Szerk.: Rodrigues P. – Eckersall D. – de Almeida A., Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 128-146.
47. de Hoffman E. – Stroobant V. (2003): *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Wiley, Toronto, 133.
48. Dekkers J. C. M. (2004): Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *Journal of Animal Sciences*, 82(13). 313-328.

49. Delbaere L. T. - Sudom A. M. - Prasad L. - Leduc Y. - Goldie H. (2004): Structure/function studies of phosphoryl transfer by phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1697(1-2). 271–278.
50. Doherty M. K. - McLean L. - Hayter J. R. - Pratt J. M. - Robertson D. H. - El-Shafei A. - Gaskell S. J. - Beynon R. J. (2004): The proteome of chicken skeletal muscle: changes in soluble protein expression during growth in a layer strain. *Proteomics*, 4(7). 2082-93.
51. Dreyfuss G. - Kim V. N. - Kataoka N. (2002): Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(3). 195-205.
52. Dutt M. J. - Lee K. H. (2000): Proteomic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 11. 176-179.
53. Dyballa N. - Metzger S. (2009): Fast and sensitive Colloidal Coomassie G-250 staining for proteins in polyacrilamide gels. *Journal of Visualised Experiments*, 30. 1431.
54. Eckersall P. D. - de Almeida A. M. - Miller I. (2012): Proteomics, a new tool for farm animal science. *Journal of Proteomics*, 75. 4187-4189.
55. Einat P. - Bergman Y. - Yaffe D. - Shani M. (1987): Expression in transgenic mice of two genes of different tissue specificity integrated into a single chromosomal site. *Genes & Development*, 1(10), 1075-1084.
56. Erdődi F. (2003): Antipeptid antitestek előállítása és alkalmazása fehérjék azonosítására Western blottal. In: *Alapvető molekuláris biológiai módszerek*. Szerk.: Dombrádi V. DE OEC Elnökségi Hivatala, Debrecen, 30.1-30.11.
57. Eszenyi P. - Sztrik A. - Babka B. - Prokisch J. (2011): Elemental, Nano-Sized (100-500 nm) Selenium Production by Probiotic Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 1(2). 148-152.
58. Fee J. – Teitelbaum D. (1972): Evidence that superoxide dismutase plays a roll in protecting red blood cells against peroxidative hemolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 49. 150-158.
59. Felius M.(1985): *Cattle Breeds of the world*. MSD AGVET, USA, 234.

60. Fisher A. B. (2011): Peroxiredoxin 6: A Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A2 Activities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(3). 831-44.
61. Fitzgerald M. C. - Parr G. R. - Smith L. M. (1993): Basic matrixes for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins and oligonucleotides. *Analytical Chemistry*, 65(22). 3204–3211.
62. 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.
63. Fridovich I. (1978): The biology of oxigen radicals. *Science*, 201(4359). 875-880.
64. Gaál T (1998): Glutation peroxidázok. *Magyar állatorvosok lapja*. 120. 160-164.
65. Gallop P. M. – Blumenfeld O. O. - Seifter S. (1972): Structure and Metabolism of Connective Tissue Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 41. 617-672.
66. Gáspárdy A. (2000): A cigája vagy berke. In: *Eleven örökség*, Szerk.: Bodó I., Agroinform Kiadó és Nyomda Kft., Budapest.
67. Gergely V. (2006): Fehérje-elválasztási módszerek bevezetése a szelén módosulatanalitikába. Doktori (PhD) értekezés, Corvinus Egyetem, Budapest.
68. Głogowski R. (2013): Effect of dietary organic selenium on fatty acid composition in nutria (*Myocastor coypus* Mol.) livers. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(2). 170–175.
69. Gracy R. W. - Talent J. M. - Zvaigzne A. I. (1998): Molecular wear and tear leads to terminal marking and the unstable isoforms of aging. *Journal of Experimental of Zoology*, 282(1-2). 18-27.
70. Green D. E. - Albers P. H. (1997): Diagnostic criteria for selenium toxicosis in aquatic birds: histologic lesions. *Journal of Wildlife Disease*, 33(3). 385-404.
71. 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.

72. Hajós GY. - Idei M. (2001): Elektroforetikus és elektrokratográfiás módszerek fejlődése és alkalmazási lehetőségei I. Magyar Kémikusok Lapja, 56. 364-368.
73. Hajós GY. (2000): A húsfehérjék humánbiológiai megítélése. A Hús, 1. 16-18.
74. Hamelin M. – Sayd T. – Chambon T. – Bouix J. – Bibé B. – Milenkovic B. – Leveziel H. – Georges M. – Clop A. – Marinova P. – Laville E. (2007): Differential expression of sarcoplasmic proteins in four heterogeneous ovine skeletal muscles. *Proteomics*, 7. 271–280.
75. Han J. Z. – Wang J. B. (2008): Proteomics: present and future in food science and technology. *Trends in Food Science & Technology*, 19. 26-30.
76. Hanson R. W. (1997): Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annual Review of Biochemistry*, 66. 581-611.
77. Harangi S. (2013): Ultrahangos mérési technika alkalmazása szarvasmarhák hústermelő képességének és vágóértékének vizsgálatára. Doktori (PhD) értekezés, Debreceni Egyetem, Debrecen.
78. 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.
79. Heinz G. H. - Hoffman D. J. - LeCaptain L. J. (1996): Toxicity of seleno-L-methionine, seleno-DL-methionine, high selenium wheat, and selenized yeast to mallard ducklings. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 30(1). 93-9.
80. Herbert B. (2005): Pitfalls of sample preparation for isoelectric focusing in proteomics. In: *Handbook of isoelectric focusing and proteomics*. Szerk.: Garfin D. – Ahuja S., Academic Press, Massachusetts, USA.
81. Hers H. G. (1983): The control of glycolysis and gluconeogenesis by protein phosphorylation, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 302. 27–32.
82. Hir H. L. - Gatfield D. - Izaurralde E. - Moore M. J. (2001): The exon–exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense mediated mRNA decay. *EMBO Journal*, 20(17). 4987-4997.

83. Hir H. L. – Gatfield D. – Izaurralde E. - Park M. J M. - Hee M. (2006): The Post-Translational Synthesis of a Polyamine-Derived Amino Acid, Hypusine, in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A). *Journal of Biochemistry*, 139(2). 161–169.
84. Hoffmann F. W. - Hashimoto A. C. - Shafer L. A. - Dow S. - Berry M. J. - Hoffmann P. R. (2010): Dietary selenium modulates activation and differentiation of CD4+ T cells in mice through a mechanism involving cellular free thiols. *Journal of Nutrition*, 140(6). 1155-1161.
85. 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.
86. Hollung K. – Grove H. - Mosleth E. - Sidhu M. S. - Berg, P. (2008): Comparison of muscle proteome profiles in pure breeds of Norwegian Landrace and Duroc at three different ages. *Meat Science*, 81. 487–492.
87. Hollung K. - Veiseth E. - Jia X. - Faergestad E. M. - Hildrum K. J. (2007): Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. *Meat Science*, 77. 97–104.
88. Hudecz F. (2003): Proteomika az új kihívás. *Lege Artis Medicinæ*, 13(3). 216-224.
89. Iizuka Y. - Sakurai E. - Maeda K. - Hikichi N. (1993): Effects of selenium on the glycolysis and gluconeogenesis system in rat liver. *Yakugaku Zasshi*, 113(7). 525-531.
90. Jefferies J. R. (2005): 2D gel electrophoresis for proteomics tutorial. Parasitology Group, Institute of Biological Sciences, University of Wales at Aberystwyth.
91. Johnson B. D. - Schumacher R. J. - Ross E. D. - Toft D. O. (1998): Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *Journal of Biological Chemistry*, 273(6). 3679–3686.
92. Joseph P. – Suman S. P. – Rentfrow G. – Li S. – Beach C. M. (2012): Proteomics of muscle-specific beef color stability. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 60(12). 3196-3203.

93. Jung, T. - Catalgol B. - Grune T. (2009): The proteasomal system. *Molecular Aspects of Medicine*, 30. 191-296.
94. Jurie C. - Robelin J. - Picard B. - Renand G. - Geay Y. (1995): Inter-animal variation in the biological characteristics of muscle tissue in male limousin cattle. *Meat Science*, 39. 415–425.
95. Kadarmideen H. N. – von Rohr P. – Janss L. L. G. (2006): From genetical genomics to systems genetics: potential applications in quantitative genomics and animal breeding. *Mammalian Genome*, 17(6). 548-564.
96. Kang S. W. - Baines I. C. - Rhee S. G. (1998): Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *Journal of Biological Chemistry*, 273. 6303–6311.
97. Keady S. M. – Kenny D. A. – Ohlendieck K. – Doyle S. – Keane M. G. – Waters S. M. (2013): Proteomic profiling of bovine *M. longissimus lumborum* from Crossbred Aberdeen Angus and Belgian Blue sired steers varying in genetic merit for carcass weight. *Journal of Animal Science*, 91. 654-665.
98. Keller A. - Berod A. - Dussailant M. - Lamande N. - Gros F. - Lucas M. (1994): Coexpression of alpha and gamma enolase genes in neurons of adult rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, 38. 493–504.
99. Kim H. S. - Manevich Y. - Feinstein S. I. - Pak J. H. - Ho Y. S. - Fisher A. B. (2003): Induction of 1-cys peroxiredoxin expression by oxidative stress in lung epithelial cells. *American Journal of Physiology Lung Cellular Molecular Physiology*, 285. 363–369.
100. 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.
101. 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.
102. Kim N. K. – Lim J. H. – Song M. J. – Kim O. H. – Park B. Y. – Kim M. J. – Hwang I. H. – Lee C. S. (2007): Developmental proteomic profiling of porcine

- skeletal muscle during postnatal development. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 20. 1612–1617.
103. Kim N. K. - Park H. R. - Lee H. C. - Yoon D. - Son E. S. - Kim Y. S. - Kim S. R. - Kim O. H. - Lee C. S. (2010): Comparative studies of skeletal muscle proteome and transcriptome profilings between pig breeds. *Mammalian Genome*, 21(5-6). 307-319.
  104. Koen A. N. - Goodman M. (1969): Aconitate hydratase isozymes: subcellular location, tissue distribution and possible subunit structure *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*, 191(3), 698–701.
  105. Komjáthy Gy. - Maknics Z. - Márkó J. - Mentés K. - Racskó P. - Tímár L. (1996): *Gazdaképzés tankönyve, Állattenyésztési ismeretek. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest, 287-290.*
  106. Köhler A. - Bajorek M. - Groll M. - Moroder L. - Rubin D. M. - Huber R. - Glickman M. H. - Finley D. (2001): The substrate translocation channel of the proteasome. *Biochimie*, 83. 325-332.
  107. Kukovics S. - Jávora A. (2002): A cigája fajta és jövője. In: *Génmegőrzés, régi háziállatfajták értéke. Szerk.: Jávora A. - Mihók S., Debrecen, 103-147.*
  108. Kukovics S. - Molnár A. - Jávora A. - Gáspárdi A. - Dani Z. (2003): A hazai cigája juhállományok változatai és termelési különbségei. *EU konform mezőgazdaság és élelmiszerbiztonság, II. kötet, SZIE MKK, DE ATC MTK, Gödöllő, 184-200.*
  109. Kusza Sz. - Nagy I. - Németh T. - Molnár A. - Jávora A. - Kukovics S. (2010): The genetic variability of Hungarian Tsigai sheep. *Archive für Tierzucht*, 53 (3). 309-317.
  110. Larsen M. O. - Rolin B. (2004): Use of the Gottingen minipig as a model of diabetes, with special focus on type 1 diabetes research. *ILAR Journal*, 45. 303–313.
  111. 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 Food Chemistry*, 55(14). 5834–5841.

112. Lee C. K. - Allison D. B. - Brand J. - Weindruch R. - Prolla T. A. (2002): Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99. 14988–14993.
113. Lippolis J. D. - Peterson-Burch P. D. – Reinhardt T. A. (2006): Differential expression analysis of proteins from neutrophils in the periparturient period and neutrophils from dexamethasonetreated dairy cows. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 111. 149–164.
114. Lippolis J. D. - Reinhardt T. A. (2008): Centennial Paper: Proteomics in animal science. *Journal of Animal Science*, 86. 2430-2441.
115. MacArthur D.G. - Seto J. T. - Chan S. - Quinlan K.G. – Raftery J.M. - Turner N. – Nicholson M. D. – Kee A. J. – Hardeman E. C. - Gunning P.W. - Cooney G. J. - Head S. I. - Yang N. - North K. N. (2008): An Actn3 knockout mouse provides mechanistic insights into the association between alpha-actinin-3 deficiency and human athletic performance. *Human Molecular Genetics*, 17. 1076-1086.
116. Maltin C. - Balcerzak D. - Tilley R. - Delday M. (2003). Determinants of meat quality: tenderness. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(2). 337–347.
117. Maltin C. A. - Sinclair K. D. - Warriss P. D. - Grant C. M. - Porter A. D. - Delday M. I. - Warkup C. C. (1998): The effects of age at slaughter, genotype and finishing system on the biochemical properties, muscle fibre type characteristics and eating quality of bull beef from suckled calves. *Animal Science*, 66. 341-348.
118. Mancini R. A. – Hunt M. C. (2005): Current research in meat color. *Meat Science*, 71(1). 100–121
119. Manso M. A. - Léonil J. - Jan G. - Gagnaire V. (2005): Application of proteomics to the characterisation of milk and dairy products. *International Dairy Journal*, 15. 845-855.
120. Marcus F. - Gontero B. - Harrsch P. B. - Rittenhouse J. (1986): Amino acid sequence homology among fructose-1,6-bisphosphatases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 135(2). 374–81.
121. Marin-Guzman J. - Mahan D. C. - Chung Y. K. - Pate J. L. - Pope W. F.(1997): Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue

- responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. *Journal of Animal Science*, 75(11). 2994-3003.
122. Marouga R. - Stephen C. - Hawkins D. C. E. (2005): The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 382. 669–678.
  123. Matasova L. V. - Popova T. N. (2008): Aconitate Hydratase of Mammals under Oxidative Stress *Biochemistry (Mosc)*. 73(9). 957-64.
  124. Matt P. - Fu Z. - Fu Q. - Van Eyk J. E. (2008): Biomarker discovery: proteome fractionation and separation in biological samples. *Physiological Genomics*, 14(33). 12-7.
  125. Maughan D. W. - Henkin J. A. - Vigoreaux J. O. (2005): Concentrations of glycolytic enzymes and other cytosolic proteins in the diffusible fraction of a vertebrate muscle proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4. 1541–1549.
  126. McKinnon R. A. - McManus M. E. (1996): Localization of cytochromes P450 in human tissues: implications for chemical toxicity. *Pathology*, 28. 148 -155.
  127. 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.
  128. Michael A. (1998): Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology *Journal of Cellular Biochemistry*. 66(2). 133–140.
  129. Million R. – Miuzzo M. - Sbrignadello S. – Murphy E. – Puricelli L. - Tura A. – Bertacco E. – Rattazzi A. – Iori E. - Tessari P. (2010): Delta2D and Proteomweaver: Performance evaluation of two different approaches for 2-DE analysis. *Electrophoresis*, 31. 1311–1317.
  130. Minárik P. - Tomásková N. - Kollárová M. - Antalík M. (2002): Malate dehydrogenases—structure and function. *Gen. Physiol. Biophys.*, 21 (3). 257–65.
  131. Mitchell G. B. – Clark M. E. – Caswell J. L. (2007): Alterations in the bovine bronchoalveolar lavage proteome induced by dexamethasone. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 118. 283–293.

132. Miyaguchi K. (2004): Localization of selenium-binding protein at the tips of rapidly extending protrusions. *Histochemistry and Cell Biology*, 121(5). 371-376.
133. Molloy M. P. (2000): Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Analytical Biochemistry*, 280. 1–10.
134. Morzel M. – Terlouw C. – Chambon C. – Micol D. – Picard B. (2008): Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Science*, 78. 297–304.
135. Muirhead H. – Watson H. (1992): Glycolytic enzymes: from hexose to pyruvate, *Current Opinion of Structural Biology*, 2. 870–876.
136. Murata S. – Yashiroda H. - Tanaka K. (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10. 104-115.
137. Musrati R. A. - Kollárová M. - Mernik N. - Mikulášová D. (1998). Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *General Physiology and Biophysics*, 17(3). 193–210.
138. Nakajima-Iijima S. – Hamada H. – Reddy P. – Kakunaga T. (1985): Molecular structure of the human cytoplasmic fJ-actin gene: Interspecies homology of sequences in the introns (recombinant DNA/DNA sequence/Southern blotting/nucleotide sequence comparison). *Cell Biology*, 82. 6133-6137.
139. Navarro-Alarcon M. – Cabrera-Vique C. (2008): Selenium in food and the human body: A review. *Science of the Total Environment*, 400. 115-141.
140. Novotniné D. G. - Árnýasi M. (2005): A szapora merinó juh fajta fenntartása és továbbnemesítése molekuláris biológiai módszerek segítségével. In.: Gyep, Állat, Vidék, Kutatás, Tudomány. Szerk.: Jávora A., Debreceni Egyetem, Debrecen, 193-199.
141. O'Donnella R. - Holland J. V. - Deeth H. C. - Alewood P. (2004): Milk proteomics. *International Dairy Journal*, 14. 1013–1023.
142. O'Farrell P. H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 250. 4007–4021.

143. Oe M. - Ohnishi-Kameyama M. - Nakajima I. - Muroya S. - Shibata M. - Ojima K. - Kushibiki S. - Chikuni K. (2011): Proteome analysis of whole and water-soluble proteins in masseter and semitendinosus muscles of Holstein cows. *Animal Science Journal*, 82(1). 181-186.
144. 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.
145. Ohlendieck K. (2010): Proteomics of skeletal muscle glycolysis. *Biochimica Biophysica Acta*, 1804(11). 2089–2101.
146. Ohlendieck K. (2011): Skeletal muscle proteomics: current approaches, technical challenges and emerging techniques. *Skeletal Muscle*, 1(6). 1-31.
147. Ordway G. A. - Garry D. J. (2004): Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *Journal of Experimental Biology*, 207(20). 3441–3446.
148. Ou X. - Ji C. - Han X. - Zhao X. - Li X. - Mao Y. - Wong L. L. - Bartlam M. - Rao Z. (2006): Crystal structures of human glycerol 3-phosphate dehydrogenase 1 (GPD1). *Journal of Molecular Biology*, 357(3). 858–869.
149. Ouali A. - Herrera-Mendez C. H. – Coulis G. – Becila S. – Boudjellal A. – Aubry L. – Sentandreu M. A (2006): Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 74. 44–58.
150. Pang X. Y. - Hua X. G. - Yang Q. - Ding D. H. - Che C. Y. - Cui L. (2007): Interspecies transplantation of gut microbiota from human to pigs. *ISME Journal*, 1. 156–162.
151. Patton W. F. (2002): Detection technologies in proteome analysis. *Journal of Chromatography B*, 771. 3-31.
152. Periasamy M. - Strehler E. E. - Garfinkel L. I. - Gubits R. M. - Ruiz-Opazo N. - Nadal-Ginard B. (1984): Fast skeletal muscle myosin light chains 1 and 3 are produced from a single gene by a combined process of differential RNA transcription and splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 259(21). 13595–13604.

153. Peshavaria M. - Day I. N. (1991): Molecular structure of the human muscle-specific enolase gene (ENO3). *Biochemical Journal*, 275. 427–433.
154. Philips R. W. - Panepinto L. M. - Spangler R. - Westmoreland N. (1982): Yucatan miniature swine as a model for the study of human diabetes mellitus. *Diabetes*, 31. 30–36.
155. 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.
156. Posch A. (szerk.) (2008): 2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation Voll. Humana Press, Totowa, USA.
157. Quant A. D. - Pescatore A. J. - Pierce J. L. - McClelland K. M. - Rentfrow G. R. - Cantor A. H. - Ford M. J. (2011): Effect of dietary selenium yeast (Sel-Plex) and vitamin E supplementation to broilers on meat quality characteristics of raw and marinated breast fillets. *International Poultry Scientific Forum*.
158. Rabilloud T. (1999): Solubilization of proteins in 2-D electrophoresis. An outline. *Methods in Molecular Biology*, 112. 9–19.
159. Rahimpour M. - Soheili M. - Eslami N. – Fayaz A. – Sardari S. - Vaziri B. (2007): Carrier Ampholyte Isoelectric Focusing Based Two-Dimensional Electrophoresis in Preliminary Screening of Differential Proteomics Analysis. *Chromatographia*, 66. 133-136.
160. Rakonjac M. - Fischer L - Provost P. - Werz O - Steinhilber D. - Samuelsson B. - Radmark O. (2006): Coactosin-like protein supports 5-lipoxygenase enzyme activity and up-regulates leukotriene A4 production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35). 13150–13155.
161. Reinhardt T. A. - Lippolis J. D. (2006): Bovine Milk Fat Globule Membrane Proteome. *Journal of Dairy Research*, 73. 406–416.
162. Rhee S. - Chae H. - Kim K (2005): Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, 38(12). 1543–1552.
163. Roland N. - Baudon L. N. - Flinois J. P. - Beaune P. (1994): Hepatic and intestinal cytochrome P-450 glutathione-S-transferase and UDP-glucuronosyl

- transferase are affected by six types of dietary fibre in rats inoculated with human whole fecal flora. *Journal of Nutrition*, 124. 1581-1587.
164. Salyi G. - Banhidi G. - Szabo E. - Gonye S. - Ratz F. (1993): Acute selenium poisoning in broilers. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 48. 22-26.
  165. Sanudo C. – Macie E. S. – Olleta J. L. – Villarroel M. – Panea B. - Alberti P. (2004): The effects of slaughter weight, breed type and ageing time on beef meat quality using two different texture devices. *Meat Science*, 66. 925–932.
  166. Scheffler T. L. - Gerrard D. E. (2007): Mechanisms controlling pork quality development: the biochemistry controlling postmortem energy metabolism. *Meat Science*, 77. 7–16.
  167. Schulz H. (2008): Oxidation of fatty acids in eukaryotes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (5th Edition)*, Szerk: Vance D. E. - Vance J., Elsevier, Amsterdam, 131-154.
  168. Seideman S. C. – Cross H. R. – Smith G. C. – Durland P. R. (1984): Factors associated with fresh meat color: A review. *Journal of Food Quality*, 6(3). 211–237,
  169. Shevchenko A. - Wilm M. - Vorm O. - Mann M. (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68(5). 850-858.
  170. Shorthose W. R. - Harris P. V. (1990): Effect of Animal Age on the Tenderness of Selected Beef Muscles. *Journal of Food Science*, 55. 1-8.
  171. Sirover M. A. (1999): New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1432. 159-184.
  172. Sjöblom B. - Salmazo A. - Djinović-Carugo K. (2008): Alpha-actinin structure and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(17). 2688-2701.
  173. Small J. V. – Rottner K. – Kaverina I. (1999): Functional design in the actin cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(1). 54–60.

174. Smolenski G. - Haines S. - Kwan F. Y. - Bond J. - Farr V. - Davis S. R. (2007): Characterisation of host defence proteins in milk using a proteomic approach. *Journal of Proteome Research*, 6. 207–215.
175. Stagsted J. - Bendixen E. - Andersen H. J. (2004): Identification of specific oxidatively modified proteins in chicken muscles using a combined immunologic and proteomic approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12). 3967–3974.
176. Stef D. S. – Stef L. – Jianu C. – Druga M. – Danci M. - Alda S. - Alda L.(2011): The influence of level and source of selenium on productive performance and meat quality of broiler chickens. *Journal: Food, Agriculture and Environment*, 9(1). 296-298.
177. Sweeney H. L. - Bowman B. F. - Stull J. T. (1993): Myosin light chain phosphorylation in vertebrate striated muscle: regulation and function. *American Journal of Physiology*, 264. 1085-1095.
178. Szabó Z. - Szeline Szomor J. - Foeldi I. - Janaky T. (2012): Mass spectrometry-based label free quantification of gel separated proteins. *Journal of Proteomics*, 75(18). 5544-5553.
179. Taghizadeh A. - Zakeri A. - Rezapour A. (2012): Comparative Effect of Vitamin E and Vitamin E-Selenium Compound on T4-Induced Ascites Syndrome (By T4-Supplementation of the Diet) in Broiler Chickens. *Global Veterinaria*, 9(3). 262-265.
180. Talamo F. - D'Ambrosio C. – Arena S. - Del Vecchio P.- Ledda L. – Zehender G. – Ferrara L. - Scaloni A. (2003): Proteins from bovine tissues and biological fluids: Defining a reference electrophoresis map for liver, kidney, muscle, plasma and red blood cells. *Proteomics*, 3(4). 440–460.
181. Tavarria M. - Gabriele T. - Kola I - Anderson R. L. (1996): A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones*, 1(1). 23–28.
182. Taylor C. A. - Sun Z. - Cliche D. O. - Ming H. - Eshaque B. - Jin S. - Hopkins M. T. - Thai B. - Thompson J. E. (2007): Eukaryotic translation initiation factor 5A induces apoptosis in colon cancer cells and associates with the nucleus in

- response to tumour necrosis factor alpha signaling. *Experimental Cell Research*, 313. 437–449.
183. 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.
184. Teltatham T. - Mekchay S. (2009): Proteome changes in Thai indigenous chicken muscle during growth period. *International Journal of Biological Sciences*, 5. 679-685.
185. Thomson C D. (2004): Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58. 391-402.
186. Thomson C. D. - Stewart R. D. H. (1973): Metabolic studies of [75Se] selenomethionine and [75Se] selenite in the rat. *British Journal of Nutrition*, 30(1). 139-147.
187. Thorpe C. - Kim J. J. (1995): Structure and mechanism of action of the acyl-CoA dehydrogenases. *FASEB Journal*, 9(9). 718–725.
188. Timperio A. E. - D'Alessandro A. - Parisetb L. - D'Amicia G. M. - Valentinib A. - Zollaa L. (2009): Comparative proteomics and transcriptomics analyses of livers from two different *Bos taurus* breeds: “Chianina and Holstein Friesian”. *Journal of Proteomics*, 73(2). 309-22.
189. Tishkov A. I. - Voitov L. I. (1989): Toxicological characteristics of sodium selenite in poultry. *Veterinariya (Moskva)* 11: 65-67.
190. Tózsér J. - Bedő S. (2003) *Történelmi állatfajtáink enciklopédiája*. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 148- 162.
191. Trybus K. M. (1994): Regulation of expressed truncated smooth muscle myosins. Role of the essential light chain and tail length. *Journal of Biological Chemistry*, 269(33). 20819–20822.
192. Tuma H. J. - Hendrickson R. L. - Stephens D. F. - Moore R. (1962): Influence of marbling and animal age on factors associated with beef quality. *Journal of Animal Science*, 21. 848-851.

193. Vachek H. - Wood J. L. (1972): Purification and properties of mercaptopyruvate sulfur transferase of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 258(1). 133–146.
194. Veress L. (2000): Szapora merinó. In: *Tenyésztési, és fajtahasználati útmutató*. Szerk: Jávora A. - Fésüs L., Lícium Art Könyvkiadó, és Kereskedelmi Kft., Debrecen, Szikszó, Herceghalom, 23-27.
195. Vincent B. - De Bock K. - Ramaekers M. - Van den Eede E. - Van Leemputte M. – Hespel M. – Thomis P. M. A. (2007): ACTN3 (R577X) genotype is associated with fiber type distribution. *Physiological Genomics*, 32. 58-63.
196. Vincent B. - Windelinckx A. - Nielens H. - Ramaekers M. - Van Leemputte M. - Hespel P. - Thomis M. A. (2010). Protective role of alpha-actinin-3 in the response to an acute eccentric exercise bout. *Journal of Applied Physiology*, 109(2). 564-573
197. Walker J. E. – Saraste M. – Runswick M. J. - Gay N. J. (1982): Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO Journal*, 1(8). 945–951.
198. Walton J. P. J. M. - Bond R. - Julian J. - Squires E. J. (1999): Effect of dietary flax oil and hypobaric hypoxia on pulmonary hypertension and haematological variables in broiler chickens. *British Poultry Science*, 44. 385-391.
199. Watanabe T. - Kiron V. - Satoh S. (1997): Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, 151. 185-207.
200. Webb N. B. - Kahlenberg O. J. - Naumann H. D. (1964): Factors Influencing Beef Tenderness. *Journal of Animal Science*, 23. 1027-1031.
201. Wegener G. - Krause U. (2002): Different modes of activating phosphofructokinase, a key regulatory enzyme of glycolysis, in working vertebrate muscle. *Biochemical Society Transactions*, 30(2). 264–270.
202. Wegner J. - Albrecht E. - Fiedler I. - Teuscher F. - Papstein H.J. - Ender K. (2000): Growth- and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *Journal of Animal Science*, 78. 1485-1496.

203. Weston A. R. - Rogers R. W. - Althen T. G. (2002): The Role of Collagen in Meat Tenderness. *The Professional Animal Scientist*, 18. 107–111.
204. Wu C. - Khan S. A. - Peng L. J. - Lange A. J. (2006): Roles for fructose-2,6-bisphosphate in the control of fuel metabolism: beyond its allosteric effects on glycolytic and gluconeogenic enzymes". *Advances in Enzyme Regulation*, 46(1): 72–88.
205. Xu Y. J. – Jin M. L. – Wang L. J. – Zhang A. D. – Zuo B. – Xu D. K. – Ren Z. Q. – Lei M. G. – Mo X. Y. – Li F. E. – Zheng R. – Deng C. Y. – Xiong Y. Z. (2009): Differential proteome analysis of porcine skeletal muscles between Meishan and Large White. *Journal of Animal Science*, 87(8). 2519-2527.
206. Yang J. - Satish C. K. – Hanson R. W (2009): What Is the Metabolic Role of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase? *Journal of Biological Chemistry*, 284. 27025-27029.
207. Zaparty M. - Esser D. - Gertig S. - Haferkamp P. - Kouril T. - Manica A. - Pham T. K. - Reimann J. - Schreiber K. - Sierocinski P. - Teichmann D. - van Wolferen M. - von Jan M - Wieloch P. - Albers S. V. - Driessen A. J. - Klenk H. P - Schleper C. - Schomburg D. - van der Oost J. - Wright P. C. - Siebers B. (2010): „Hot standards" for the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles*, 14(1). 119-142.
208. Zapata I. – H. N. Zerby – M. Wick (2009): Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and the tenderness differential. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57. 4956–4963.
209. Zhang J. - Wang H. - Yan X. - Zhang L. (2004): Comparison of short-term toxicity between Nano-Se and selenite in mice. *Life Sciences*, 76(10). 1099-1109.
210. Zhang Q. – Carpenter C. J. (2013): Proteomics in Milk and Milk Processing. In: *Proteomics in Foods*. Szerk.: F. Toldrá and L. M. L. Nollet, Springer Science, New York, 223-246.
211. Zhang Y. - Yuksel K. U. - Gracy R. W. (1995): Terminal marking of avian triosephosphate isomerases by deamidation and oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, 317. 112–120.

212. Zhao C. – Zan L. – Wang Y. – Updike M. S. – Liu G. – Bequette B. J. – Baldwin R. L. – Song J. (2014): Functional proteomic and interactome analysis of proteins associated with beef tenderness in Angus cattle. *Livestock Science*, 161. 201-209.
213. Zhou X. - Wang Y. (2011): Influence of dietary nano elemental selenium on growth performance, tissue selenium distribution, meat quality, and glutathione peroxidase activity in Guangxi Yellow chicken. *Poultry Science*, 90(3):680-686.
214. Zhu Z. – Zhang S. – Liu H. – Shen H. – Lin X. – Yang F. – Zhou Y. Z. – Jin G. – Ye M. – Zou H. – Zhao Z. K. (2012): Corrigendum: A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nature Communications*, 1112. 1-8.
215. Zoidis E. - Pappas A. C. - Georgiou C. A. - Komaitis E. - Feggeros K. (2010): Selenium affects the expression of GPx4 and catalase in the liver of chicken. *Comparative Biochemistry and Physiology Part. B Biochemistry and Molecular Biology*, 155(3). 294-300.
216. 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.
217. Internet 1: [http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\\_2651.pdf](http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_2651.pdf) (2014-06-30)
218. Internet 2: [http://net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy\\_doc.cgi?docid=A0300044.FVM](http://net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy_doc.cgi?docid=A0300044.FVM) (2014-06-30)
219. Internet 3: <https://www.piercenet.com/instructions/2161478.pdf> (2014-06-30)
220. Internet 4: <http://www.bio-rad.com/en-hu/applications-technologies/troubleshooting-2-d-electrophoresis-gels-with-2-d-doctor> (2014-06-30)

## 11. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

### A dolgozat témájában megjelent publikációk:

#### Impakt faktoros folyóirat:

**Gulyás G.** - Czeglédi L. - Béri B. - Harangi S. - Csósz É. - Szabó Z. - Janáky T. - Jávora 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. - Jávora 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. - Jávora 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.- Jávora A.(2012): Csirkemáj proteomjának változása szelén indukció hatására – 2D PAGE optimalizálás. *Acta Agraria Debreceniensis*, 2012/50. 9-13.

**Gulyás G.** - Béri B.- Jávora A. - Márk L. - Csósz 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. – Csósz 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. - Keserű 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. - Jávor A. (2011): Selenium as Feed Supplement Changes Proteome of Chicken Liver. *COST-Farm Animal Proteomics Spring Meeting 2011* 39.

**Gulyás G.** - Jávor 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. - Jávor 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. - Jávor 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 A. – **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.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Dr. Jávor András professzor úrnak az elmúlt években nyújtott széleskörű támogatásáért, a kutatások elvégzéséhez szükséges feltételek biztosításáért és szakmai munkám irányításáért.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Czeglédi Levente egyetemi adjunktusnak a vizsgálataim lebonyolításához, értékeléséhez és a dolgozat elkészítéséhez nyújtott önzetlen segítségéért.

Köszönöm Dr. Béri Béla egyetemi docensek és Dr. Harangi Sándornak a hízómarha projektben nyújtott segítségükért.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Prokisch József egyetemi docensnek a házityúk kísérletben nyújtott segítségéért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Csősz Éva egyetemi adjunktusnak, Kulcsár Andreának, Lábiscsák Péternek és Kalló Gergőnek, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet munkatársainak, a tömegspektrometriás mérések kivitelezéséért, a gélelemző szoftver használatáért, és sok hasznos tanácsukért, melyekkel segítették munkámat.

A tömegspektrometriás vizsgálatok elvégzéséért köszönettel tartozom Dr. Janáky Tamásnak és Dr. Szabó Zoltánnak, a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézet munkatársainak.

Szeretném megköszönni Dr. Keserű Juditnak és Dr. Birkó Zsuzsannának, a Humángenetikai Tanszék munkatársainak, hogy gyakorlati tapasztalataikkal segítették laboratóriumi munkámat.

A laboratóriumi munkában nyújtott segítségükért, szeretnék köszönetet mondani szakdolgozóinknak Pohóczky Krisztinának és Radócz Tündének.

Köszönettel tartozom Dr. Oláh Jánosnak, a dolgozatban szereplő fotók elkészítéséért.

Megköszönöm az Állattenyésztéstudományi Tanszéken dolgozó valamennyi Kolléga együttműködését és segítségét.

Hálás köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, türelmükért és támogatásukért.

## **NYILATKOZATOK**

### **NYILATKOZAT**

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Karán, az Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola keretében készítettem, a Debreceni Egyetem doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2014-07-21

.....  
a jelölt aláírása

### **NYILATKOZAT**

Tanúsítom, hogy Gulyás Gabriella doktorjelölt 2009-2014 között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2014-07-21

.....  
a témavezető aláírása