

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A humán plazmaproteomot reprezentáló Analitkönyvtár
létrehozása, jellemzése és felhasználása monoklonális
antitestek antigénjeinek azonosítására**

Kovács András

Témavezető:

Dr. Guttman András



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK.....	4
1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
2.1. A vérplazma	6
2.2. Szemelvények a plazmafrakcionálás történetéből.....	6
2.2.1. Kicsapási módszerek	7
2.2.1.1. Kisózás	7
2.2.1.2. Kicsapás szerves oldószerekkel	7
2.2.2. Kromatográfiás módszerek.....	8
2.2.2.1. Kromatográfiás módszerek alkalmazása terápiás fehérjék kinyerése céljából....	8
2.2.2.2. Laboratóriumi léptékű kromatográfiás alkalmazások a biomedicinális kutatásokban.....	8
2.2.3. Plazmafrakcionálás proteomikai célú kutatásokhoz.....	9
2.2.3.1. Affinitásalapú depletálási módszerek.....	11
2.2.3.2. Nem-affinitásalapú depletálási módszerek.....	12
2.2.3.3. Többlépéses plazmafrakcionálás.....	13
2.3. Biomarkerek	14
2.4. Az Analitkönyvtár jellemzése során vizsgált biomarkerek	14
2.5. Monoklonális antitest-proteomika.....	15
3. CÉLKITŰZÉSEK	16
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	17
4.1. Humán plazma	17
4.2. Vegyszerek	17
4.3. Módszerek	17
4.3.1. A kromatográfiás lépésekhez használt készülékek és állófázisok.....	18
4.3.2. Az előállított frakciók fehérjekoncentrációinak mérése	18
4.3.3. A könyvtárfrakciók fehérjeösszetételének analízise	18
4.3.4. Az albumin depletálása	19
4.3.5. Az immunglobulinok kivonása	19
4.3.6. Az albumin- és immunglobulin-depletált plazma koncentrációja és dializálása	20
4.3.7. A depletált, dializált plazma kisózási	20
4.3.8. Méretkizárásos kromatográfia (géliszűrő)	20
4.3.9. Kationcserés kromatográfia.....	21
4.3.10. Anioncserés kromatográfia	21
4.3.11. Hidrofób interakciós kromatográfia	21
4.3.12. A frakciók kódolása	22
4.3.13. Dot blot vizsgálatok	22
4.3.14. Western blot és amidofekete-festés.....	23
4.3.15. Immunprecipitáció és az eluátumok SDS-PAGE- és Western blot analízise.....	24
4.3.16. Az antigének meghatározása tömegspektrometriával	25
4.3.17. A kísérletek során felhasznált oldatok összetétele	25
5. EREDMÉNYEK.....	27
5.1. Az Analitkönyvtár előállítása.....	27
5.1.1. Albumindepletálás.....	27
5.1.2. Immunglobulin-depletálás.....	28
5.1.3. A depletált plazma töményítése és puffercseréje	29
5.1.4. A depletált, dializált plazma előfrakcionálása kisózással.....	30
5.1.5. Méretkizárásos kromatográfia.....	31
5.1.6. Kationcserés kromatográfia.....	32
5.1.7. Anioncserés kromatográfia	34
5.1.8. Hidrofób interakciós kromatográfia	35

5.2. Az Analitkönyvtár karakterizálása I.: a D vitaminkötő fehérje dúsulási útjának követése a frakcionálás különböző szintjeiben	37
5.2.1. A D vitaminkötő fehérje dúsulási útjának vizsgálata dot blottal.....	37
5.2.2. A D vitaminkötő fehérje jelenlétének igazolása Western blottal	40
5.3. Az Analitkönyvtár karakterizálása II.: a Könyvtár átfogó szűrése.....	41
5.3.1. A fibrinogén akkumulációjának vizsgálata	42
5.3.2. A D vitaminkötő fehérje akkumulációjának vizsgálata.....	43
5.3.3. A haptoglobin akkumulációjának vizsgálata.....	44
5.3.4. A C9 komplement komponens akkumulációjának vizsgálata.....	45
5.3.5. Az alfa-2-makroglobulin akkumulációjának vizsgálata.....	46
5.3.6. A hemopexin akkumulációjának vizsgálata.....	47
5.3.7. Az albuminspecifikus antitesttel végzett szűrés eredményei	48
5.4. Az Analitkönyvtár felhasználása monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosításra	49
5.4.1. A Bsi0144-es antitesthez tartozó antigén azonosítása.....	50
5.4.1.1. A Bsi0144-es antitestet tartalmazó keverék vizsgálata dot blottal	50
5.4.1.2. A Bsi0144-es antitest antigénje jelenlétének igazolása.....	53
5.4.1.3. A 65%-G3-C26 frakció immunprecipitációja	54
5.4.1.4. A Bsi0144-es antitest antigénjének tömegspektrometriás meghatározása	54
5.4.1.5. A Bsi0144-es ellenanyag antigénjének igazolása	55
5.4.2. A Bsi0051-es antitesthez tartozó antigén azonosítása.....	56
5.4.2.1. A Bsi0051-es antitestet tartalmazó keverék vizsgálata	56
5.4.2.2. A kiválasztott frakciók immunprecipitációja	57
5.4.2.3. A Bsi0051-es antitest antigénjének tömegspektrometriás meghatározása	58
5.4.3. Az antigénazonosítási kísérletek összefoglalása	59
6. MEGBESZÉLÉS	60
6.1. Az Analitkönyvtár létrehozása	60
6.2. A D vitaminkötő fehérje dúsulási útjának követése	63
6.3. Az Analitkönyvtár átfogó szűrése	64
6.4. Az Analitkönyvtár felhasználása monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosításra	67
6.5. A vizsgálatok tapasztalatainak összegzése.....	67
7. ÖSSZEFOGLALÁS	69
8. SUMMARY	70
9. ÚJ EREDMÉNYEK, MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS AZOK JELENTŐSÉGE	71
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	72
10.1. Az értekezésben hivatkozott közlemények	72
10.2. Publikációs lista	80
11. TÁRGYSZAVAK.....	83
11.1. Tárgyszavak	83
11.2. Keywords	83
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	84
13. FÜGGELÉK	85
13.1. Egyéb közlemények	85
13.1.1. Magyar nyelvű folyóiratszövegek	85
13.1.2. Előadások az értekezés témaköréből.....	85
13.1.3. Előadások az értekezés témakörén kívül.....	85
13.1.4. Poszterek az értekezés témaköréből	86
13.1.5. Poszterek az értekezés témakörén kívül	86
13.1.6. Oktatás, ismeretterjesztés	87

RÖVIDÍTÉSEK

BLAC	boronsav-lektin-affinitáskromatográfia
BSA	borjú szérumalbumin
ECL	felerősített kemilumineszcencia
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , az Egyesült Államok élelmiszer- és gyógyszerellenőrző hatósága
FPLC	gyors fehérje-folyadékkromatográfia
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HP-M-LAC	nagyhatékonyságú multilektin-affinitáskromatográfia
HRP	tormaperoxidáz
HSA	humán szérumalbumin
Ig	immunglobulin
MARS	<i>multiple affinity removal system</i> , affinitásalapú, több plazmakomponenst párhuzamosan eltávolító eszköz
MDLC	többdimenziós folyadékkromatográfia
M-LAC	multilektin-affinitáskromatográfia
MMP	mátrix-metalloproteináz
PAGE	poliakrilamid-gélelektroforézis
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
TRIS	trisz(hidroximetil)-aminometán
VDBP	D vitaminkötő fehérje
VLDL	nagyon alacsony denzitású lipoprotein
vWF	von Willebrand faktor

1. BEVEZETÉS

A biomarkerkutatások során a vérplazma proteomjának vizsgálata különös jelentőséggel bír. A plazma a teljes vértérfogat kb. 55%-át teszi ki, és széles koncentrációtartományban tartalmaz különböző biológiai funkciójú fehérjéket. Nagyfokú összetettsége folytán a plazmában közepes vagy kis mennyiségben megtalálható fehérjék jellemzése és azonosítása gyakran nehéz és hosszadalmas. Minél kisebb egy fehérje koncentrációja a plazmában, elemzése annál nagyobb térfogatú mintát kíván. Mindemellett vizsgálatához munka- és időigényes mintaelőkészítés szükséges, mielőtt az egyes fehérjék különféle bioanalitikai módszerekkel történő megfelelő tisztításához hozzá lehet látni, melyek azonban esetenként megváltoztathatják a fehérjék natív állapotát. Az extrém széles koncentrációtartomány okozta nehézségek mellett a plazmakutatások/biomarkerkutatások feladata még a fehérje-izoformák, poszttranszlációs módosítások azonosítása is, melyek szerkezetileg kismérvű, de a fehérje funkciójában jelentős változásokat eredményezhetnek.

A plazmaproteom kutatását célzó vizsgálatok leggyakrabban tömegspektrometriát használnak a biomarkerként szóba jöhető fehérjék azonosítására. Ezek a technológiák azonban érzékenységi, reprodukálhatósági és áteresztőképességi korlátaik miatt nem minden esetben alkalmasak a teljes proteom profilírozásához szükséges koncentrációtartomány átfogására.

A monoklonális antitest-proteomika olyan specifikus ellenanyagokat használ, melyek a legalacsonyabb koncentrációtartományban is felismerik a legtöbb fehérjét. A nagyszámú előállított antitest a plazmaproteom átfogó szűrését teszi lehetővé, és alkalmas lehet a fehérjék különböző variánsainak (izoformák, poszttranszlációs módosítások, stb.) detektálására, melyet a fehérje tömegspektrometriás meghatározása követhet.

Doktori értekezésemben egy olyan módszer kifejlesztéséről számolok be, mely a mintaelőkészítési fázis során a fehérjék natív állapotának megőrzésére törekszik, majd a monoklonális antitest-proteomika-tömegspektrometria munkafolyamatát használja fehérjék azonosítására.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A vérplazma

A plazma a vér alakos elemek nélküli folyékony sejtközötti állománya, a teljes extracelluláris folyadék térfogatának mintegy egyötödét teszi ki. A vérplazma az orvostudományi kutatások és a gyógyszeripar egyik legnagyobb mennyiségben vizsgált és feldolgozott anyaga; kiemelkedő jelentősége abból adódik, hogy tartalmazza a test különböző szöveteiből származó fehérjék ezreit (Anderson és Anderson, 2002), mintegy tükrözve a szervezet aktuális állapotát. A plazma széles dinamikus fehérjekoncentrációtartományában a legnagyobb és legkisebb mennyiségben lévő fehérjék koncentrációi között közel 12 nagyságrendnyi különbség figyelhető meg. A humán szérumalbumin (HSA) és az immunglobulinok képviselik az összes plazmafehérje mennyiségének csaknem 80%-át (Burnouf, 2007).

2.2. Szemelvények a plazmafrakcionálás történetéből

Akkreditált üzemekben évente több millió liter plazmát frakcionálnak világszerte gondosan előkészített, ellenőrzött, szigorúan higiénikus körülmények között, javarészt a frakcionálási ipar kialakulása kezdetén kifejlesztett kicsapási és kromatográfiás módszereket alkalmazva (Burnouf, 2007). A gyógyászati célokra értékesített plazmafehérje-termékek csaknem fele a szérumalbumin feldolgozásából származott az elmúlt évtizedekben; velük kezelhető pl. a hipoproteinémia, hypoalbuminémia vagy nagy vérvesztéssel járó állapotok (Denizli, 2011). A biomedicina szintén jelentős mennyiségű plazmát használ, pl. terápiás fehérjék tisztítására vagy diagnosztikai kutatások során. A legnagyobb mennyiségben megtalálható összetevők, különösen az albumin és az immunglobulinok eltávolítása ilyenkor alapvető cél, mivel az akár 12 nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációban jelenlévő potenciális biomarkerek kimutatását és azonosítását megnehezítik. A proteomikai vizsgálatokat – pl. kétdimenziós gélelektroforézis, tömegspektrometria – megelőzően precíz, nem ritkán hosszadalmas és költséges mintaelőkészítési/-előfrakcionálási módszerek szükségesek a leggyakoribb plazmakomponensek kivonásához. A hagyományos kicsapási és kromatográfiás technikák, pl. géliszűrés, ioncsere vagy hidrofób interakció alkalmazása – sok esetben, a hatékonyság növelése érdekében, többdimenziós elrendezésben – mellett elterjedt

váltak az affinitásalapú eljárások is, melyekkel a különböző, nagy koncentrációban lévő fehérjéket könnyen, gyorsan, párhuzamosan el lehet távolítani. Értekezésem Irodalmi áttekintésében a mérőföldkönek számító eredményeken kívül ismertebb és talán kevésbé ismert módszereket mutatok be a plazmafrakcionálás terjedelmes irodalmából.

2.2.1. Kicsapási módszerek

2.2.1.1. Kisózás

A 19. században a neves német kémikus, Franz Hofmeister munkatársaival megállapította, hogy a sók befolyásolják a fehérjék oldékonyságát. Egy- és kétvegyértékű kationok sóit használták szérum kisózására, és az alacsonyabb sókoncentráció mellett kicsapással kapott frakciót „globulin”-nak, míg a magasabb töménységű sóval kisózott frakciót „albumin”-nak nevezték el (Kunz és mtsai, 2004). Az eljárást évtizedekig használták albumin-, α -, β - és γ -globulinfrakciók kinyerésére (Howe, 1921; Kibrick és Blonstein, 1948). A mechanizmus plazma esetében is eredményesen használható a megfelelő koncentrációjú, pH-jú és ionerősségű puffer gondos megválasztásával; munkám során én is alkalmaztam.

2.2.1.2. Kicsapás szerves oldószerekkel

Az ipari méretű plazmafrakcionálás kialakulásában az Edwin Cohn nevével fémjelzett úttörő módszernek (Cohn és mtsai, 1946) volt a legnagyobb szerepe. A Cohn-féle hideg etanolos frakcionálás célja tiszta albumin előállítása volt a klinikum számára, de az immunglobulinok szeparálására is alkalmasnak bizonyult. Az eredeti többlépéses protokoll alapján fejlesztették ki később a Kistler–Nitschmann-frakcionálást (Kistler és Nitschmann, 1962). A fagyasztott plazma felengedése során az alvadási faktorokat krioprecipitátum formájában távolítják el, majd a következő lépésben a fibrinogén kicsapása történik 8%-os etanollal. A második etanolos kicsapás során – melyet a Cohn-módszer 25%-os etanollal végez 6,9-es pH-n, míg a Kistler–Nitschmann-féle metódus 19%-os etanollal 5,85-es pH-n – vonják ki az immunglobulinokat. Az etanolkoncentrációt két (Cohn) vagy egy lépésben (Kistler–Nitschmann) 40%-ra emelik, így tisztítják meg az oldatban maradt albumint az α - és β -globulinoktól, majd a végső precipitálást az albumin izoelektromos pontja környékén végzik el, 4,8-es pH-n. A Cohn-frakcionálást mind a mai napig alkalmazzák, elsősorban az Egyesült

Államokban, míg Kistler és Nitschmann eljárása inkább Európában örvend népszerűségnek (Matejtschuk és mtsai, 2000). Az etanolos kicsapás és a hőkezelés kombinációja nagy tisztaságú albumin előállítására is alkalmasnak bizonyult (de Villiers és Wilson, 1978). A koncentráció, a pH, az ionerősség és a hőmérséklet megfelelő beállítása mellett az éter is felhasználható albumin, γ -globulin, fibrinogén és protrombin frakcionálására (Kekwick és mtsai, 1955).

2.2.2. Kromatográfiás módszerek

2.2.2.1. Kromatográfiás módszerek alkalmazása terápiás fehérjék kinyerése céljából

A kromatográfiás technikák mind laboratóriumi, mind pedig ipari méretekben használatosak terápiás plazmafehérjék izolálására. Mivel a plazmafehérjék töltéssel rendelkeznek, az ioncsere akár önmagában vagy más kromatográfiás módszerekkel kiegészítve is megfelelő plazmafrakcionálásra, de használható egy frakcionálási eljárás záró tisztítási lépéseként is. A méretkizárásos kromatográfia szintén alkalmazható többlépéses frakcionálások után a szennyeződések eltávolítására (Burnouf, 1995).

Az immunglobulinok polietilén-glikolos kicsapása után a felülúszóból QAE-Sephadex A-50 ioncserélő gyanta használatával Vasileva és munkatársai 95%-nál nagyobb tisztaságú albumint állítottak elő (Vasileva és mtsai, 1981). Ioncsere (DEAE-Sepharose oszlop), affinitáskromatográfia (arginin-Sepharose 4B) és gélszűrés (Sephacryl S-300 HR) egymás utáni alkalmazásával Tanaka és munkatársai intravénás beadásra alkalmas IgG-t állítottak elő (Tanaka és mtsai, 1998). A különböző hemofíliák (véralvadási faktor-hiánybetegségek) kezelésében használt véralvadási faktorkok izolálását is többnyire kromatográfiás módszerekkel végzik. Te Booy és munkatársai először anioncserével (DEAE-Sephadex A-50) szeparálták a II-es, IX-es és X-es faktort, majd affinitáskromatográfiával (dimetilamino-propil-karbamil-pentil-Sepharose CL-4B mátrix) a VIII-as, más néven anti-hemofíliás faktort (te Booy és mtsai, 1990).

2.2.2.2. Laboratóriumi léptékű kromatográfiás alkalmazások a biomedicinális kutatásokban

A laboratóriumi gyakorlatban a különböző plazmafehérjék izolálása többféle célból történhet, pl. enzimkarakterizálás, tisztítás, immunizálás, szerkezetelemzés,

biomarkerkutatás, az ipari méretű eljárások modellezése, orvosi alkalmazások. A proteomikai vizsgálatok során alkalmazott módszerekkel külön részben foglalkozom (ld. 2.2.3. pont és alpontjai).

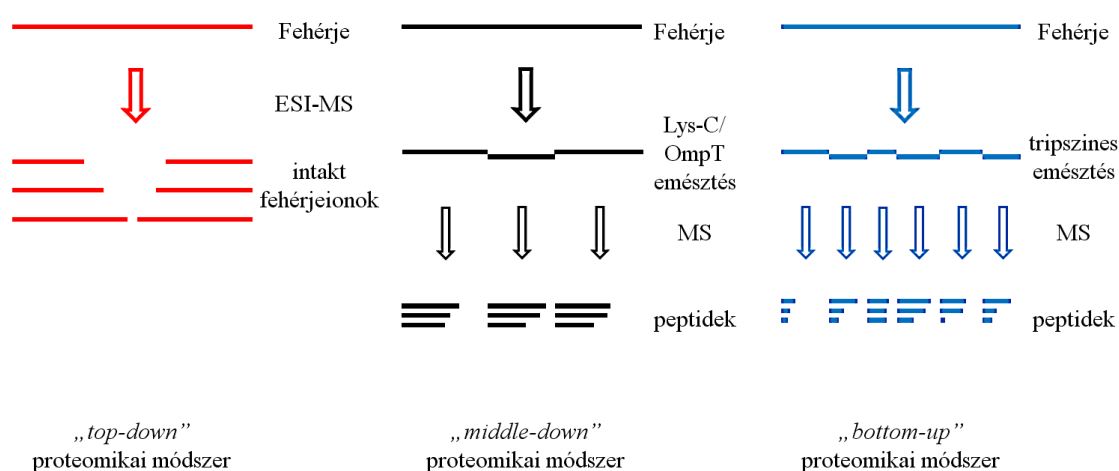
Az ioncserés kromatográfiát laboratóriumi méretekben is használják véralvadási faktorok tisztítására. A vérben a VIII-as faktor a von Willebrand faktorról (vWF) komplexet képez, ez utóbbi fehérje szükséges stabilitása fenntartásához. A komplex koncentrátumaival kezelhető az A típusú hemofília (VIII-as faktor hiánya) és a von Willebrand szindróma (vWF-deficiencia) (Federici, 2003). A VIII-as faktor önmagában is alkalmazható lehet hemofiliás betegek terápiájában (Lewis és mtsai, 2007). A VIII-as faktor anioncserés elválasztását a von Willebrand faktortól Josic és munkatársai oldották meg, miután először ammónium-szulfátos kicsapás és anioncsere kombinációjával izolálták a két glikoprotein komplexét, majd a második anioncserés lépésben a VIII-as faktort szeparálták, és az albuminnal történő együttes izolálás útján stabilizálták (Josic és mtsai, 1994). Egy 2010-ben publikált közlemény szerint a szerzők először a plazmát közvetlen anioncserés elválasztásnak vetették alá, majd a VIII-as faktort és K vitaminfüggő faktorokat is tartalmazó frakcióból utóbbiakat méretkizárásos kromatográfiával szeparálták (Cheng és mtsai, 2010).

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC, *high performance liquid chromatography*) megjelenésével a plazmafehérjék tisztításával foglalkozó kutatók kezébe újabb hatékony eszköz került. Egy tanulmány D vitaminkötő fehérje HPLC-vel és alacsony nyomású módszerrel történő izolálását hasonlította össze. Előbbi módszer alkalmazásával a szerzők jelentősen rövidebb idő alatt jóval tisztább fehérjefrakciót kaptak, és a hozam is sokkal nagyobb volt (Taylor és mtsai, 1986). A HPLC és az affinitáskromatográfia kombinálásával fejlesztették ki biomolekulák szeparálására a nagyhatékonyságú affinitáskromatográfiát, mely egyesíti előbbi gyorsaságát és nagy felbontóképességét utóbbi specificitásával (Ernst-Cabrera és Wilchek, 1988).

2.2.3. Plazmafrakcionálás proteomikai célú kutatásokhoz

A biológiai minták proteomikai jellemzése az életfolyamatok jobb megértése mellett új biomarkerek felfedezésén keresztül betegségek részletesebb leírásához vezethet. A modern tömegspektrometriás berendezésekkel a fehérjék gyorsan, pontosan, nagy érzékenységgel és megfelelő alkalmazás esetén jól reprodukálható módon

tanulmányozhatók (Nilsson és mtsai, 2010). Az ún. „*top-down*” proteomikai módszer fehérjék, az elterjedtebb „*bottom-up*” metódus proteolitikus (jobbára tripszines) emésztéssel kapott peptidek szintjén végzi az analízist (Walsh és mtsai, 2010). A kettő tulajdonságait ötvöző „*middle-down*” rendszer a tripszinnél ritkábban hasító enzimet (pl. Lys-C endopeptidázt vagy OmpT proteázt) használ, hosszabb peptideket hoz létre, ezáltal nagyobb fehérjemolekulákat valamint poszttranszlációs módosításokat tud vizsgálni (Wu és mtsai, 2005; Wu és mtsai, 2012). A háromféle megközelítést hasonlítom össze az 1. ábrán.



1. ábra: A „*top-down*”, „*middle-down*” és „*bottom-up*” proteomikai módszerek sematikus összehasonlítása. ESI-MS: elektropray ionizáció-tömegspektrometria.

A plazma nagy komplexitása és összetevőinek széles dinamikus koncentrációtartománya miatt megfelelő mintaelőkészítés (pl. előfrakcionálás) szükséges proteomjának biomarkerek felfedezése céljából történő analízise előtt (De Bock és mtsai, 2010). A mintapreparálási folyamat a nagyobb mennyiségben lévő plazmakomponensek eltávolításával kezdődik, melyek a kisebb koncentrációjú alkotókat elfedve azok kimutatását megnehezítik. Ez az ún. depletálási lépés szűkíti a dinamikus koncentrációtartományt, és feldúsítja a biomarkerkutatási szempontból jelentős fehérjéket (Selvaraju és El Rassi, 2012). Az affinitáson alapuló módszereket széles körben használják a leggyakoribb összetevők depletálására, legtöbbször a többdimenziós folyadékkromatográfiás elválasztásokat megelőzően. Három vagy több különböző elválasztási módszer egymást követő alkalmazása lényegesen megkönnyíti a

kisebb mennyiségben lévő összetevők detektálását. Ilyen például a kétdimenziós poliakrilamid-gélelektroforézis, amely először izoelektromos pont (pI) majd molekulasúly alapján szeparálja a fehérjéket, az extrém pI értékekkel rendelkező vagy 150 kDa fölötti vagy 10 kDa alatti molekulasúlyú analitok elemzése esetén azonban nehézségek adódhatnak alkalmazása során. A gél festése után láthatóvá tett fehérjefoltok a gélből kivághatók és tömegspektrometriával elemezhetők. A többdimenziós folyadék-kromatográfia (MDLC, *multi-dimensional liquid chromatography*) szintén megfelelő technika a proteomikai mintaelőkészítés során (Delahunty és Yates, 2007; Tang és mtsai, 2008).

2.2.3.1. Affinitásalapú depletálási módszerek

Amíg az ipari méretű plazmafrakcionálás során az albumin az egyik fő termék, a plazmaproteomikában el kell távolítani a mintából, hogy az alacsonyabb koncentrációjú komponensek kimutatása könnyebb legyen. Travis és munkatársai azt találták, hogy a szefarózyöngyökön immobilizált Cibacron Blue nevű klór-triazin típusú festékanyag erősen kötődik az albuminhoz (Travis és mtsai, 1976). A felfedezés utat nyitott az egyik legelterjedtebben használt affinitáskromatográfiás albumindepletálási módszernek. Később kiderült, hogy a festék nem kizárólag albumint köt, hanem más, nem-albumin-típusú fehérjéket is (Gianazza és Arnaud, 1982; Subramanian, 1984), így alkalmas pl. interferon, lipoproteinek, véralvadási faktorok, nukleotidfüggő enzimek izolálására is (Knight Jr és Fahey, 1981; GE Healthcare, 2007).

A plazma második leggyakoribb komponenscsoportját az immunglobulinok alkotják. Eltávolításukra elterjedt módszer a tiofil interakciós kromatográfia (Porath és mtsai, 1985), melyben egy szulfon- és egy tioéter-csoport egymás közvetlen szomszédságában található az állófázison. Az agarózhoz kapcsolt „T-gél” kötötte az IgG, IgM és IgA molekulákat. Optimális körülmények között megmaradt a szérumból kivont immunglobulinok natív állapota (Hutchens és Porath, 1986). Kísérleteim során én is használtam a tiofil interakciós kromatográfiát, mely plazma esetén is alkalmazható.

A párhuzamosan több gyakori összetevőt eltávolító, ún. *multiple affinity removal system* (MARS) eszközök kifejlesztése nagy előrelépést jelentett, tovább növelve az alacsony koncentrációban lévő fehérjék detektálásának és azonosításának lehetőségét. Ezek a modern oszlopok szintén immobilizált antitesteket vagy ún. *affibody*-kat (szintetikus,

antigének kötésére alkalmas antitest-mimetikumokat) tartalmazhatnak. Ilyen pl. az a 14 fehérjét eltávolító affinitásoszlop, melyet Zolotarjova és munkatársai fejlesztettek a következő plazmafehérjék depletálására: albumin, transzferrin, haptoglobin, IgG, IgA, alfa-1-antitripszin, fibrinogén, alfa-2-makroglobulin, alfa-1-savas glikoprotein, C3 komplement komponens, IgM, apolipoprotein A1, apolipoprotein A2 és transztiretin (Zolotarjova és mtsai, 2008).

Szubproteomoknak nevezzük a plazmaproteomon belül elkülöníthető fehérjecsoportokat (Medvedev és mtsai, 2012). Egyik ilyen a glikoproteom, melynek frakcionálására gyakran használnak affinitásalapú technikákat, úgymint pl. a lektin- vagy pszeudolektin-affinitáskromatográfiát (Hageman és Kuehn, 1992; Kobata és Endo, 1992). A multilektin-affinitáskromatográfiás (M-LAC, *multi-lectin affinity chromatography*) oszlopokban különféle lektinek kombinációja található, melyek MARS-rendszerrel kapcsolva alkalmasak a leggyakoribb – többségében glikozilált – plazmafehérjék kinyerésére (Dayarathna és mtsai, 2008). A glikoproteom célzott frakcionálására kifejlesztett stabil és specifikus automatizált platform a nagy hatékonyságú multilektin-affinitáskromatográfia (*HP-M-LAC, high performance multi-lectin affinity chromatography*). Az eljárás magában foglal egy depletálási lépést albuminellenes antitesttel majd egy konkanavalin A, *jacalin* és búzacsíra-agglutinin növényi lektineket tartalmazó M-LAC oszloppal (Kullolli és mtsai, 2010). Glikoproteinek megkötésére és szelektív elúciójára dolgozta ki a Horváth Laboratórium a boronsav-lektin-affinitáskromatográfiát (BLAC, *boronic acid-lectin affinity chromatography*), mely kombinálta a boronsav- (egy pszeudolektin) és lektin- (konkanavalin A, *jacalin* és búzacsíra-agglutinin) affinitáskromatográfiákat (Monzo és mtsai, 2007). Egy későbbi fejlesztés során létrehoztak boronsavval és konkanavalin A-val töltött mikrooszlopokat különböző glikoproteinek plazmából (vagy szérumból) történő hatékony izolálására és dúsítására, amelyek ezután alávethetők pl. glikánprofilírozásnak (Monzo és mtsai, 2008).

2.2.3.2. Nem-affinitásalapú depletálási módszerek

Az affinitásalapú módszerek mellett folyamatosan fejlesztenek egyéb technikákat, melyek alkalmasak lehetnek az albumin, az immunglobulinok és egyéb, a plazmában nagy koncentrációban jelenlévő komponensek depletálására. Habeeb és Francis a

kisózást (4 M ammónium-szulfát) kombinálta anioncserés (DEAE-cellulóz) kromatográfiával, így vonva ki az immunglobulin-frakciót a plazmából (Habeeb és Francis, 1976). Mahn és munkatársai az ammónium-szulfátos kicsapást hidrofób interakciós kromatográfiával egyesítették és depletáltak több nagy koncentrációban lévő fehérjét, úgymint albumint, immunglobulinokat, alfa-1-antitripsint, haptoglobint és fibrinogént. A módszer egyszerűsége és alacsony költsége miatt az antitest-alapú technikák egyik alternatívája lehet (Mahn és mtsai, 2010; Mahn és Ismail, 2011).

2.2.3.3. Többlépéses plazmafrakcionálás

A különböző elválasztási módszerek egymás utáni – többlépéses – alkalmazása elősegíti az alacsonyabb koncentrációban lévő plazmafehérjék dúsulását és azonosítását. Jin és munkatársai kationcserés kromatográfiát követő fordított fázisú HPLC-szeeparálást használtak emberi plazma lineáris ioncsapdás tömegspektrometriás analízist megelőző előfrakcionálására, és 1292 fehérjét azonosítottak, köztük számos olyat, melynek fiziológiás koncentrációja 10 ng/ml alatt van (Jin és mtsai, 2005). Az ioncsere és a fordított fázisú kromatográfia kombinációjával létrehozott platform alkalmas volt poszttranszlációs módosítások feltárása mellett bázikus és hidrofób fehérjék vizsgálatára (Levreri és mtsai, 2005; Wang és Zhong, 2012). A mindezidáig egyik legátfogóbb plazmaproteom-térképet Liu és munkatársai készítették el kationcserés kromatográfia, fordított fázisú folyadékkromatográfia, ionmobilitás-spektrometria valamint tömegspektrometria (SCX-LC-IMS-MS) kombinálásával, és 37 842 peptidszekvencia analízise eredményeképpen 2928 fehérje esetében nagyon magas szekvencia-lefedettséget kaptak (Liu és mtsai, 2007). Wang és munkatársai intakt fehérjék nagy felbontású, háromdimenziós analízisére alkalmas módszert (IPAS, *intact-protein-based quantitative analysis system*) fejlesztettek ki, mely immundepletálásból, izoelektromos fókuszálásból, fordított fázisú folyadékkromatográfiából valamint SDS-poliakrilamid-gélelektroforézisből (SDS-PAGE) állt, és a plazmafehérjék tömegspektrometriás elemzése előtti elválasztására szolgált (Wang és mtsai, 2005).

Az értekezésemben részletesen leírásra kerülő Analitkönyvtár-készítés is a többlépéses plazmafrakcionálási eljárások közé sorolható.

2.3. Biomarkerek

A National Institute of Health (NIH) Biomarkers Definitions Working Group 2001-es definíciója alapján a biomarker normális és patológiás biológiai folyamatok valamint terápiás beavatkozásokra adott gyógyszerválaszok objektíven mérhető és értékelhető indikátora (Atkinson és mtsai, 2001). A biomarkerkutatások célja, hogy adott betegségekre specifikus markereket fedezzen fel, melyek optimális esetben egy bizonyos betegsége vagy kórfolyamatra kizárólagosan jellemzőek. A plazma átfogó képet ad a szövetek pillanatnyi állapotáról, ezáltal a laboratóriumi diagnosztika egyik legfontosabb vizsgálati célpontja is. A plazma fehérjéi is lehetnek biomarkerek, szintjüknek a fiziológiás értékhez viszonyított változása a szervezetben zajló kóros folyamatokat jelezheti (diagnosztikus marker) vagy előre jelezheti (prognosztikus marker), mint például a prosztataspecifikus antigén (PSA), melynek szintje bizonyos prosztatabetegségek, úgymint prosztatarák vagy jóindulatú megnagyobbodás esetén emelkedik (Hernández és Thompson, 2004).

2.4. Az Analitkönyvtár jellemzése során vizsgált biomarkerek

Az Analitkönyvtár jellemzése során az 5.3. pontban részletezett módon kiválogatott frakciókat reagáltattam olyan monoklonális antitestekkel, melyek lehetséges biomarkerekre specifikusak. A *fibrinogén* (I-es faktor) a véralvadásban játszott szerepe mellett számos patológiás állapot jelzője. A fehérje megváltozott szintje a plazmában utalhat gyulladásra (Davalos és Akassoglou, 2012), traumára (Martini, 2009) vagy valamilyen rosszindulatú daganatos elváltozásra (Guo és mtsai, 2009). Az 52-59 kDa molekulatömegű *D vitaminkötő fehérje* (VDBP, *vitamin D-binding protein*) a D vitaminnak és metabolitjainak fontos hordozófehérjéje. Az albumin, α -fötóprotein és α -albumin/afamin géncsalád tagja, szterinkötő kapacitása mellett ez a glikoprotein köti és eliminálja az aktint a keringésből (*scavenger*), valamint részt vesz a zsírsavtranszportban is (Speeckaert és mtsai, 2006). Szklerózis multiplexben (Disanto és mtsai, 2011) vagy dohányzáshoz köthető betegségekben (Bortner és mtsai, 2011) bizonyulhat biomarkernek. A *haptoglobin* szint mérése a klinikai gyakorlatban a hemolízis igazolásának egyik legfontosabb markere (Körmöczi és mtsai, 2006). Akut fázis fehérje, gyulladások, fertőzések és rosszindulatú betegségek során termelődik (Kang és mtsai, 2011), és különböző daganatos betegségek potenciális markere (Shah és

mtsai, 2010; Miyoshi és mtsai, 2010). A *C9 komplement komponens* lehetséges új tüdőrák- (Guergova-Kuras és mtsai, 2011) és vastagbélrák-biomarker (Murakoshi és mtsai, 2011). Az *alfa-2-makroglobulin* (α_2M) egy proteínáz-inhibitor (Ikari és mtsai, 2001), melyet nagyjából a máj szintetizál, és az összes plazmafehérje mennyiségének mintegy 3-5%-át teszi ki. Szintjének jelentős növekedését figyelték meg nefrotikus szindrómás betegekben (de Sain-van der Velden és mtsai, 1998), emellett a májfibrózis lehetséges biomarkere is lehet hepatitisz C vírus okozta krónikus fertőző májgyulladásban szenvedőkben (Ho és mtsai, 2010). A *hemopexin* szintjének csökkenése összefüggésben lehet hemolitikus anémiával, akut intermittáló porfíriával vagy krónikus neuromuszkuláris betegségekkel (Chiabrando és mtsai, 2011). A *humán szérumalbumin* szintjének csökkenése utalhat vese- (de Mattos, 2011) vagy májbetegségekre (Obialo és mtsai, 1999).

2.5. Monoklonális antitest-proteomika

A monoklonális antitest-proteomika egy, a közelmúltban kifejlesztett eljárás, melynek során nagyszámú betegségspecifikus antitestet nyernek. Az ellenanyagok használata lehetővé teszi potenciális biomarkerek globális szűrését. A nagy áteresztőképességű vizsgálmódszer korábbi kutatások során alkalmasnak bizonyult krónikus obstruktív tüdőbetegséggel (COPD, *chronic obstructive pulmonary disease*) (Csanky és mtsai, 2007) és tüdőrákkal (Wang és mtsai, 2010; Guergova-Kuras és mtsai, 2011) összefüggő biomarkerek felfedezésére és azonosítására. Röviden, ennek a fordított proteomikai megközelítésnek a lényege, hogy komplex biológiai minták ellen nagyszámú olyan monoklonális antitestet termeltetnek, melyek antigénjét a méréseknek ebben a részében szükséges ismerni. Az antitesteket klinikai mintákkal – pl. plazma – reagáltatják, és a pozitív jelet adó mintákból immunprecipitációt végeznek. Az immunprecipitáció eluátumát SDS-PAGE-vel elemzik, Western blottal validálják, majd tömegspektrometriával azonosítják az ismeretlen antigént.

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. Specifikus depletálási, kicsapási és kromatográfiás technikákkal előállítani egy átfogó, több száz frakciót tartalmazó Analitkönyvtárat, melynek frakciói néhány 10 vagy 100 natív fehérjét tartalmazhatnak oly módon, hogy ellensúlyozzák azt a több nagyságrendbeli koncentrációkülönbséget, mely a kis vagy közepes koncentrációban lévő plazmafehérjék izolálását és azonosítását megnehezíti. Céлом volt egy olyan nagyságú humán plazma proteomkönyvtár létrehozása, mely potenciális betegség-markerek tárházát jelentheti, és kellő mennyiségű analitot szolgáltat a plazmában közepes és alacsony koncentrációban megtalálható fehérjék és izotípusaik immunszeparációval egybekötött folyadékkromatográfiás-tömegspektrometriás azonosításához.
2. Az Analitkönyvtár karakterizálása és alkalmazhatóságának megállapítása monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosítás céljára. A D vitaminkötő fehérje szeparációs útjának a frakcionálás különböző szintjein végig követésével arra kerestem a választ, hogy a kezdeti elválasztási lépések után kapott összetettebb frakciókhoz képest megfigyelhető-e a fehérje dúsulása, látható-e esetleg egyedi akkumuláció a későbbi, kevésbé komplex frakciókban. A Könyvtár átfogó szűrését olyan monoklonális ellenanyagokkal végeztem, melyek ismert plazmafehérjékre specifikusak, és azt vizsgáltam, hogy a fehérjék eloszlása a frakciókban megfelel-e az ismert fizikai, kémiai és biokémiai tulajdonságaik alapján vártnak, és a mérési eredmények összeegyeztethetők-e szakirodalmi adatokkal.
3. A Könyvtár frakcióinak felhasználása monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosításra egy komplex, a humán plazmaproteom teljes profilírozására kifejlesztett ellenanyagkönyvtárból származó monoklonális antitestek segítségével.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Humán plazma

Az Analitkönyvtár készítéséhez az Innovative Research nevű cégtől (Novi, MI, Egyesült Államok) vásárolt, 18 és 65 év közötti életkorú egészséges donoroktól levett vérből készült, az Egyesült Államok élelmiszer- és gyógyszerellenőrző hatósága, a US Food and Drug Administration (FDA) szabályai szerint egybe gyűjtött, vírusellenőrzött, 500 ml térfogatú plazmát használtam.

4.2. Vegyszerek

A kálium-kloridot, guanidin-hidrokloridot, kálium-szulfátot, nátrium-foszfátot, trisz(hidroximetil)-aminometánt (továbbiakban TRIS), glicint, nátrium-dodecil-szulfátot (továbbiakban SDS), nátrium-kloridot, nátrium-dihidrogén-foszfát-monohidrátot, Tween 20-at, metanolt, Brilliant Blue R-t (Coomassie), ecetsavat, etanolt, Bradford reagenst és borjú szérumalbumint (BSA) a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, Egyesült Államok) rendeltem. Az ammónium-szulfát a Scharlautól (Sentmenat, Spanyolország), a dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrát a Riedel-de-Haëntől (Seelze, Németország), a 7,4-es pH-jú 10-szeres koncentrációjú PBS az Invitrogentől (Carlsbad, CA, Egyesült Államok), a Pierce ECL Western Blotting Substrate a Thermo Scientific-től (Rockford, IL, Egyesült Államok), az amidofekete festék az Amresco-től (Cleveland/Akron, OH, Egyesült Államok) származott. Az oldatokat Millipore (Billerica, MA, Egyesült Államok) Direct-Q 3 UV Ultrapure Water System berendezéssel tisztított vízzel készítettem.

4.3. Módszerek

A plazma többlépéses frakcionálását előkísérletek során optimalizált körülmények között végeztem. Az előkísérletek során Dr. Sperling Edit útmutatásával határoztuk meg az elválasztási lépések következő paramétereit: a minta- és elúciós pufferek összetétele és pH-ja, az áramlási sebességek, a felvinni kívánt mintamennyiségek. A dot blot kísérletek körülményeinek – a membránra felvitt fehérjék mennyisége, az első- és másodlagos antitestek hígítása, inkubációs idők – beállítását Dr. Kurucz István és Dr. Kádas János irányításával végeztem.

4.3.1. A kromatográfiás lépésekhez használt készülékek és állófázisok

Az immunglobulin-depletálás kivételével minden kromatográfiás lépést ÄKTA Purifier FPLC-készüléken (GE Healthcare, Uppsala, Svédország) kiviteleztem. Az összes művelethez (albumindepletálás, méretkizárásos kromatográfia, kationcsere, anioncsere, hidrofób interakciós kromatográfia) az apparátussal kompatibilis, a GE Healthcare által ajánlott és gyártott oszlopokat használtam. A frakciókat a berendezéshez készült és hozzákapcsolt Frac-920 frakciószedővel gyűjtöttem. A kromatográfiás jeleket 280 nm-en detektáltam, és a rendszerhez tartozó Unicorn 5.1 szoftvercsomag segítségével dolgoztam fel.

4.3.2. Az előállított frakciók fehérjekoncentrációinak mérése

A könyvtárkészítés minden lépése után a kapott frakciók koncentrációját Bradford-módszerrel (Bradford, 1976) határoztam meg, a kalibrációhoz BSA-sztenderdet használtam. 5 µl fehérjemintát adtam 250 µl Bradford Reagent-hez Greiner Cellstar 96-lyukú mikrotitráló lemezekben (Sigma-Aldrich), az abszorbanciát 595 nm-en mértem Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, Egyesült Államok) segítségével.

4.3.3. A könyvtárfrakciók fehérjeösszetételének analízise

Az előállított frakciókat SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel (SDS-PAGE) elemeztem. Az analízisek XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen) rendszerrel, Novex 4-20%-os Tris-Glycine gradiensgélekkel (Invitrogen) történtek. Futtatópufferként 25 mM TRIS-t, 192 mM glicint és 0,1% SDS-t tartalmazó, 8,6-es pH-jú oldatot használtam. Az elválasztásokat 90 percen át, 150 V feszültség alkalmazásával végeztem. A fehérjesávokat 0,2% Brilliant Blue R-t, 7,5% ecetsavat és 50% etanolt tartalmazó oldattal festettem 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A háttérfesték eltávolításához először 1 órán keresztül 10% ecetsav, 20% etanol majd éjszakán át 10% ecetsav, 5% etanol összetételű festékmentesítő oldatokat alkalmaztam. A megfestett gél UVIPro Gold géldokumentációs rendszerrel fényképeztem le (Uvitec, Cambridge, Anglia).

4.3.4. Az albumin depletálása

A könyvtárkészítés első lépése a plazma legnagyobb mennyiségben lévő összetevőjének, a humán szérumalbuminnak a depletálása volt affinitáskromatográfiával. A modern, költséges, albuminellenes antitesteket tartalmazó depletálóoszlopok kisebb mintatérfogatok feldolgozására készülnek, azokat 500 ml mennyiségű plazma esetén nem volt célszerű alkalmazni, így Blue Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) márkanévű töltetet használtam, mely Sepharose 6 Fast Flow-hoz kötve tartalmazta az albumint megkötő Cibacron Blue 3G festékanyagot. A 100 ml médiumot több részletben gyárilag töltetlen XK 26/40 kromatográfiás oszlopba töltöttem, majd 2 ml/perces áramlási sebességet alkalmazva PBS-t áramoltattam át az oszlopon a Blue Sepharose tömörítése céljából. Az 500 ml plazma depletálása 20 egyenlő, 25 ml-es részletben történt. A felolvasztott 25 ml plazmát az ÄKTA Purifier FPLC-készülék mintatartójába töltöttem, majd 2 ml/perc áramlási sebességet alkalmazva az oszlopra juttattam. Az oszlopon 7,4-es pH-jú 1-szeres koncentrációjú PBS-t áramoltattam. Az egyes depletálások során kapott átfolyó frakciókat összeöntve további frakcionálás céljából gyűjtöttem. Az oszlopra kötődött albumint (a hozzá asszociálódott és az oszlophoz esetlegesen kötődő további fehérjékkel együtt) PBS-ben oldott 1 M kálium-kloriddal eluáltam, és -70 °C-on tároltam. A futások között az oszlopot 8 M guanidin-hidrokloriddal regeneráltam, majd PBS-sel mostam a só jelenlétét mutató vezetőképesség-jel alapvonalra való visszatértéig. A regenerálási frakciókat szintén -70 °C-on tároltam.

4.3.5. Az immunglobulinok kivonása

Az immunglobulinokat tiofil interakciós kromatográfiával vontam ki a plazmából. Mind a 20 Blue Sepharose-kromatográfiás lépés után az albumindepletált átfolyóhoz 20 ml Pierce Thiophilic Adsorbent (Thermo Scientific) gyöngyöt és szilárd kálium-szulfátot adtam (végkoncentráció: 0,5 M), majd az elegyet egy éjszakán át 4 °C-on, percenkénti 120-as fordulatszámmal kevertettem. A keveréket 20 cm magasságú preparatív gravitációs üvegoszlopba (Spektrum-3D Kft., ma VWR International, Debrecen) töltöttem, és az átfolyó frakciót összegyűjtöttem. A leülepedett adszorbenst tartalmazó oszlopot 0,5 M kálium-szulfáttal mostam, és az első két 20 ml-es mosási frakciót egyesítettem az átfolyó frakcióval. Az immunglobulinokat 50 mM nátrium-foszfáttal

(pH 8,0) eluáltam a Thiophilic Adsorbent gyöngyökről, melyet ezután 8 M guanidin-hidrokloriddal regeneráltam. A depletálási lépésben kapott frakciókat további felhasználásig -70 °C-on tároltam.

4.3.6. Az albumin- és immunglobulin-depletált plazma koncentrációja és dialízisa

Az albumin- és immunglobulin-depletált plazmát 10 kDa pórusméretű Centricon Plus-70 (Millipore) centrifugális koncentrátorcsövekkel töményítettem J2-HS centrifuga (Beckman Coulter, Brea, CA, Egyesült Államok) használatával. A koncentrált plazmaoldatból a kálium-szulfátot dialízissel távolítottam el és cseréltem PBS-re. A dializálandó minták kb. 96 ml-esek voltak (290 ml plazmaoldat háromfelé osztva), a PBS-oldat pedig 2 liter térfogatú. A munkafolyamathoz 10 kDa pórusméretű SnakeSkin Pleated membránokat (Thermo Scientific) alkalmaztam, a dialízist 24 órán keresztül végeztem 4 °C-on, a PBS többszöri cseréjével.

4.3.7. A depletált, dializált plazma kisózása

Az albumin- és immunglobulin-depletált, dializált plazmát négylépéses ammónium-szulfátos kisózással előfrakcionáltam. A kicsapáshoz 35, 45, 65 és 75%-os telítettségű $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -oldatokat használtam. A megfelelő mennyiségű szilárd ammónium-szulfátot a plazmaoldathoz adtam, és 4 °C-on, folyamatos kevertetés mellett legalább 1 órán keresztül inkubáltam. A csapadékokat 15 percen át tartó, 4500/perces fordulaton végzett centrifugálással gyűjtöttem össze Beckman J2-HS centrifuga használatával, majd PBS-ben oldottam fel. A frakciókat további felhasználásig -70 °C-on tároltam.

4.3.8. Méretkizárásos kromatográfia (géliszűrés)

A kisózás során kapott frakciók méret szerinti elválasztásának előkészítése során gyárilag töltetlen XK 16/70 oszlopot több részletben megtöltöttem 130 ml Sephacryl S-200 állófázissal (GE Healthcare), melynek leülepedése után PBS-t áramoltattam át az oszlopon a médium tömörítése céljából. Az előkészítő műveletek után 60 cm magasságú gélágyat kaptam. A PBS-ben oldott fehérjecsapadékokat az ÄKTA Purifier mintatartójába töltöttem, majd 0,7 ml/perces áramlási sebességet alkalmazva az oszlopra injektáltam. A futás közben az oszlopon 7,4-es pH-jú, 1-szeres koncentrációjúra hígított PBS-t áramoltattam át, és 1 ml térfogatú frakciókat gyűjtöttem,

melyeket SDS-PAGE-vel analizáltam, majd a hasonló elektroforetikus mintázatú frakciókat egyesítettem, és a következő feldolgozási lépésig -70 °C-on tároltam.

4.3.9. Kationcserés kromatográfia

A kationcserés kromatográfia előtt a géliszűréssel kapott frakciókon puffercserét hajtottam végre. A PBS-t 5,5-es pH-jú 50 mM foszfátpufferre cseréltem 10 kDa pórusméretű Amicon Ultra (Millipore) centrifugális szűrővel. Az elválasztást a frakcionálni kívánt fehérjeoldatok mennyiségétől függően 1 vagy 5 ml médiummal töltött HiTrap SP HP oszlopokkal hajtottam végre. Az átfolyó frakciókat felfogtam, és anioncserés kromatográfiához gyűjtöttem össze, míg a kationcserélő gélre kötődött fehérjéket 0-tól 0,5 M-ig lineárisan növekvő koncentrációjú, 5,5-es pH-jú 50 mM foszfátpufferben oldott kálium-kloriddal eluáltam. Az oszlopra vitt minták fehérjetartalmának függvényében 0,5 (10 mg fehérjemennyiség alatt) vagy 1 ml-es (10 mg fehérjemennyiség fölött) frakciókat gyűjtöttem, és -70 °C-on tároltam.

4.3.10. Anioncserés kromatográfia

Az elválasztás előtt a kationcsere során gyűjtött átfolyó frakciókon puffercserét hajtottam végre. Az 50 mM foszfátpuffert (pH 5,5) 20 mM, 8,5-es pH-jú TRIS-HCl-re cseréltem 10 kDa pórusméretű Amicon Ultra centrifugális szűrő használatával. Az anioncserét a minták mennyiségétől függően 1 vagy 5 ml géllal töltött HiTrap Q HP oszlopokkal végeztem. A kationcseréhez hasonlóan 0-tól 0,5 M sókoncentrációig lineárisan növekvő KCl-gradienst alkalmaztam a médiumra kötődött fehérjék eluálásához. A kálium-kloridot 20 mM, 8,5-es pH-jú TRIS-HCl-ben oldottam fel, és az oszlopra juttatott fehérjék mennyiségének figyelembe vételével 0,5 (10 mg fehérjemennyiség alatt) vagy 1 ml (10 mg fehérjemennyiség fölött) térfogatú frakciókat gyűjtöttem, melyeket további vizsgálatokig -70 °C-on tároltam.

4.3.11. Hidrofób interakciós kromatográfia

A 20 legtermékenyebb ioncserés elválasztás során gyűjtött frakciót (>8,0 mg/ml) – melyek mindegyike anioncserés kromatográfiás elválasztásból származott – hidrofób interakciós kromatográfiával frakcionáltam tovább, HiTrap Phenyl Sepharose HP oszlopok alkalmazásával. A 45%-os ammónium-szulfátos kisózás után kapott fehérjék

további frakcionálása során nyert frakciók esetében minta- és eluáló pufferként 7,1-es pH-jú, 20 mM TRIS-HCl pufferben oldott 1 M, míg a 65 és 75%-os telítettségű sóoldattal kicsapott fehérjéket tartalmazóknál 7,1-es pH-jú, 20 mM TRIS-HCl-ben oldott 2 M ammónium-szulfátot használtam. A kétféle összetételre azért volt szükség, hogy elkerüljem a frakciókban lévő fehérjék kicsapódását az ammónium-szulfáttal történő elúció során. Az oszlopra kötődött fehérjék eluálásához 100%-tól 0%-ig lineárisan csökkenő ammónium-szulfátgradienst használtam, és minden esetben 1 ml-es frakciókat gyűjtöttem, melyeket -70 °C-ra lefagyasztva tartottam a további vizsgálatokig.

4.3.12. A frakciók kódolása

A frakciók referenciakódja a következőkből tevődik össze: ammónium-szulfát-telítettség (35, 45, 65 vagy 75), az összeöntött, géliszűréssel kapott frakció száma (G1-től G4-ig), kation- (C), anioncserés (A) vagy hidrofób interakciós kromatográfiával előállított frakció (H). A CF jelenti a kationcserés kromatográfia átfolyó frakcióját (*cation exchange chromatography flowthrough*). A C, CF, A vagy H után álló számok a frakciónak a frakciószedőben elfoglalt helyét mutatják. A fent részletezett elveket figyelembe véve pl. a 65%-G2-A19-H9 referenciakód a 65%-os ammónium-szulfáttal kicsapott, a 2. méretkizárásos kromatográfiás frakció anioncserés elválasztása során kapott 19. frakció hidrofób interakciós kromatográfiával szeparált, a frakciószedő 9-es számú mintahelyén gyűjtött frakciót jelenti.

4.3.13. Dot blot vizsgálatok

Protran BA 85 nitrocellulóz-membránt (Whatman, Maidstone, Anglia) méretre (10,5x7,0 cm) vágtam, és DHM-96 96 minta befogadására alkalmas, vákuumos dot blotkészülékbe (VWR International, Leuven, Belgium) helyeztem. XF54 230 50 vákuumpumpa (Millipore) segítségével 10 kPa szívóerőt alkalmaztam, és a frakciók koncentrációjától függően 1 vagy 3 µg fehérjét juttattam a kör alakú mintafelvívó nyílásokba. A membránt teljesen megszáritottam, majd 0,5% polivinil-pirrolidont és 0,05% Tween 20-at tartalmazó 7,4-es pH-jú PBS-oldatba (blokkoló puffer) helyeztem,

majd körkörös síkrázon 60 fordulat/perces sebességgel 30 percig blokkoltam¹. Ezután a blokkoló pufferben 1 µg/ml-re hígítottam, és a vizsgált elsődleges monoklonális antitesttel (BioSystems International Kft., Debrecen) szobahőmérsékleten 1 órán át keverés közben inkubáltam, 60 fordulat/perc sebességet alkalmazva. A membránt ezután 5-ször 1 percig vízzel mostam, ugyanennyi ideig blokkoló pufferrel, végül PBS-T (0,05% Tween 20 PBS-ben oldva) mosóoldattal. Másodlagos ellenanyagként blokkoló pufferben 8000-szeresre hígított, tormaperoxidázzal (HRP, *horseradish peroxidase*) konjugált kecske anti-egér IgG-t (Southern Biotech, Birmingham, AL, Egyesült Államok) használtam, és az inkubálást 1 órán keresztül folytattam. A membránt 5-ször 1 percig mostam PBS-T-vel. A blot előhívására a felerősített kemilumineszcencia elvén működő Pierce ECL Western Blotting Substrate kitet használtam. A membránról Gel Logic 2200 PRO géldokumentációs rendszerrel (Carestream Health, Rochester, NY, Egyesült Államok) készítettem fényképeket. A reakció pozitív kontrolljaként 0,05 µg elsődleges antitestet, míg negatív kontrollként a blokkoló puffert használtam. A szignálintenzitásokat 0,5 és 5 közötti skálán értékeltem; 0,5-es értékkel jellemeztem azt a frakciót, melynek jelerőssége épphogy megkülönböztethető volt a háttértől, míg 5-össel azt a frakciót, melynek szignálintenzitása a pozitív kontrollal volt összemérhető (azonos vagy nagyobb). A 3-nál nagyobb erősségű jelet produkáló frakciókat tartottam további vizsgálatok szempontjából alkalmasnak, míg a 3 vagy annál alacsonyabb szignálintenzitásúakat annak ellenére nem használtam, hogy jelerősségük alapján megkülönböztethetőek voltak a háttértől, feltételezve, hogy nem tartalmaznak kellő mennyiségű fehérjét.

4.3.14. Western blot és amidofekete-festés

A blokkoló/antitesthígító és mosópufferek összetételét és a membránok ellenanyagokkal történt inkubáció utáni mosásának folyamatát a 4.3.13-as pontban részleteztem. A Western blotvizsgálatok esetén frakciónként 2 µg fehérjét választottam el SDS-PAGE segítségével a 4.3.3. pontban leírt módon. Az elektroforézis befejeztével a fehérjéket a gélből Protran BA 85 nitrocellulóz-membránra transzferáltam Mini Trans-Blot Cell

¹ A nagyszámú blotvizsgálat során a költségek mérséklése érdekében a PBS-t nem az Invitrogen által készre gyártott 10-szeres koncentrációjú törzsoldatból hígítottam, hanem saját készítésű 7,4-es pH-jú puffert használtam, melynek az összetétele a következő volt: 3,8 mM nátrium-dihidrogén-foszfát, 16,2 mM dinátrium-hidrogén-foszfát, 150 mM nátrium-klorid.

blottoló készülékkel (Bio-Rad), 135 V alkalmazásával, 1 órán keresztül. A blottoló puffer összetétele az alábbi volt: 25 mM TRIS, 192 mM glicin, 20% metanol. A membránt 1 órán át blokkoltam, majd egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltam 5000-szeresre hígított elsődleges monoklonális antitesttel. Mosás után szobahőmérsékleten 1 órán keresztül rázattam HRP-konjugált kecske anti-egér IgG másodlagos ellenanyagot tartalmazó blokkoló pufferben. A blot előhívását Pierce ECL Western Blotting Substrate segítségével végeztem, és a membránt Gel Logic 2200 PRO dokumentációs rendszerrel fényképeztem le. A membránt 10% ecetsavat tartalmazó 0,05%-os amidofekete-oldattal festettem, 2-szer 10 percig mostam 5%-os ecetsavval, majd UVIPro Gold gél dokumentációs rendszer segítségével készítettem róla képet.

4.3.15. Immunprecipitáció és az eluátumok SDS-PAGE- és Western blot analízise

Az Analitkönyvtár létrehozása és vizsgálata során szoros munkakapcsolatban álltam a Debreceni Egyetem területén telephellyel rendelkező BioSystems International Kft. (BSI) biotechnológiai kisvállalattal, mely cég rendelkezik egy saját fejlesztésű biomarkerkutató és -validálási technológiai platformmal, mellyel elsőként volt képes nagy tagszámú monoklonális ellenanyagkönyvtárak létrehozására és szűrésére (Guergova-Kuras és mtsai, 2011). Munkám során ezen monoklonális antitestek közül használtam a megfelelően kiválasztottakat a dot blot- és Western blot-kísérletekhez. Az Invitrogen Dynabeads Protein G kitjével végzett immunprecipitációs kísérletek, az SDS-PAGE- és Western blot-elemzések is a cég munkatársainak közreműködésével történtek. A módszert röviden ismertetem.

A dot blot módszerrel történt szűrések során használt, az ismeretlen antigénnel pozitív reakciót mutató antitesteket Protein G-vel összekapcsolt Dynabeads gyöngyökkel (Invitrogen) kevertük össze, majd az antitestet kovalensen kötöttük a gyöngyökhöz. Immunprecipitáció céljából a gyöngyöket összekevertük az általam kiválasztott, ismeretlen antigént tartalmazó frakcióval. A gyöngyöket mostuk, majd az antigént eluáltuk. Az eluátumban lévő fehérjéket SDS-PAGE-vel választottuk el, a géleket Coomassie Blue-val festettük.

4.3.16. Az antigének meghatározása tömegspektrometriával

Az antigének meghatározása kétféle tömegspektrometriás módszerrel történt. Az SDS-PAGE gélből kivágott fragmentek tripszines emésztése után az MS-analízist az MTA Szegedi Biológiai Központ Proteomikai Szolgáltató Laboratóriumában végezték Thermo LCQ Fleet háromdimenziós ioncsapdával kapcsolt Eldex nanoHPLC-rendszerrel (Guergova-Kuras és mtsai, 2011). A specifikus immunprecipitációval kapott fehérjék oldatban történt tripszines emésztése utáni MS-vizsgálatot az MTA Kémiai Kutatóintézetének Szerkezeti Kémiai Intézetében (Budapest) kiviteleztek Q-TOF Premier tömegspektrométerrel (Waters, Milford, MA, USA), melyet *nanoflow* UHPLC-rendszerhez (Waters) kapcsoltak (Turiák és mtsai, 2011).

4.3.17. A kísérletek során felhasznált oldatok összetétele

SDS-PAGE futtatópuffer: 25 mM TRIS, 192 mM glicin, 0,1% SDS, pH 8,6

SDS-PAGE gélfestő oldat: 0,2% Brilliant Blue R, 7,5% ecetsav, 50% etanol

SDS-PAGE 1. festékmentesítő oldat: 10% ecetsav, 20% etanol

SDS-PAGE 2. festékmentesítő oldat: 10% ecetsav, 5% etanol

PBS: 3,8 mM nátrium-dihidrogén-foszfát, 16,2 mM dinátrium-hidrogén-foszfát, 150 mM nátrium-klorid, pH 7,4

Immunoglobulin-depletálás, kötőpuffer: 0,5 M kálium-szulfát

Immunoglobulin-depletálás, eluáló puffer: 50 mM nátrium-foszfát, pH 8,0

Albumindepletálás, eluáló puffer: 1 M KCl PBS-ben oldva

Albumin- és immunoglobulin-depletálás, regeneráló puffer: 8 M guanidin-hidroklorid

Ammónium-szulfát: 35%, 45%, 65% és 75%-os telítettség

Kationcserés kromatográfia, mintapuffer: 50 mM foszfátpuffer, pH 5,5

Kationcserés kromatográfia, elúciós puffer: 0-0,5 M KCl 50 mM foszfátpufferben (pH 5,5) oldva

Anioncserés kromatográfia, mintapuffer: 20 mM TRIS-HCl, pH 8,5

Anioncserés kromatográfia, elúciós puffer: 0-0,5 M KCl 20 mM TRIS-HCl-ben (pH 8,5) oldva

Hidrofób interakciós kromatográfia, minta- és eluáló puffer: 1 és 2 M ammónium-szulfát 20 mM TRIS-HCl-ben (pH 7,1) oldva

Dot blot, Western blot, blokkoló puffer: 0,5% polivinil-pirrolidont és 0,05% Tween 20-at tartalmazó 7,4-es pH-jú PBS

Dot blot, Western blot, mosópuffer: 0,05% Tween 20 7,4-es pH-jú PBS-ben oldva

Western blot, blottoló puffer: 25 mM TRIS, 192 mM glicin, 20% metanol

Amidofekete festőoldat: 0,05% amidofekete, 10% ecetsav

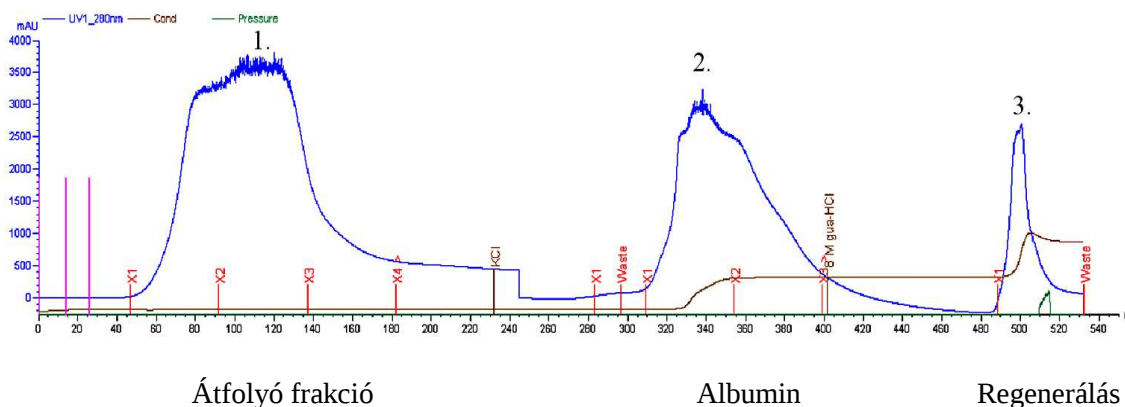
5. EREDMÉNYEK

5.1. Az Analitkönyvtár előállítás

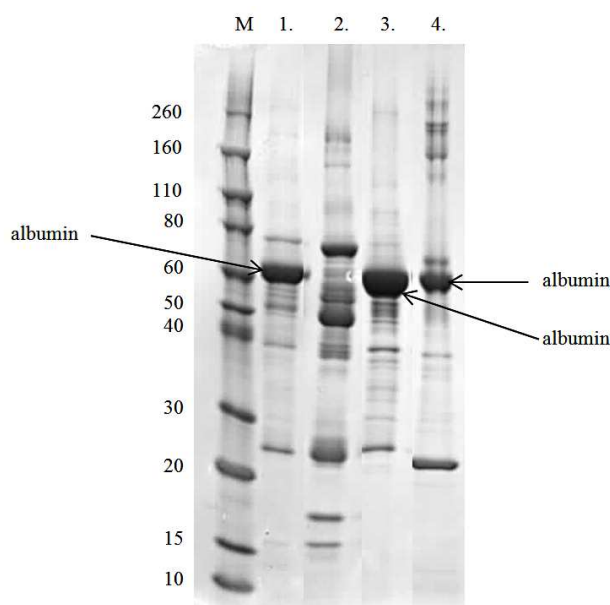
5.1.1. Albumindepletálás

A könyvtárkészítés első lépése a humán szérumalbumin depletálása volt 500 ml emberi vérplazmából, amelyhez Blue Sepharose-affinitáskromatográfiát használtam. Az elválasztás 3 frakciót eredményezett, melyek összetételét SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel vizsgáltam. Az első gyűjtött frakció az albumindepletált átfolyó volt, az egyedi depletálások – 25 ml plazma/injektálás – alkalmával 135-160 ml térfogatú átfolyó frakciókat kaptam, melyeket SDS-PAGE-vel ellenőriztem. Ahogy az elektroferogramok elemzéséből kiderült, ebben a frakcióban a kezdeti plazmához képest az albumintartalom jelentősen alacsonyabb lett. Az átfolyó gyűjtése után kálium-kloriddal eluáltam az oszlopra kötődött albumint (90-115 ml-es eluátumok), mely frakcióban a depletált HSA túlnyomó többsége, a vele asszociált fehérjék és a Cibacron Blue festékanyaghoz kötődött, az albuminétől eltérő molekulatömegű plazmafehérjéket találtam SDS-PAGE analízis során. A regenerálási frakció SDS-PAGE analízise során a 8 M guanidin-hidrokloriddal az oszlopról eltávolított, 1 M kálium-kloriddal nem eluálódott fehérjék között még mindig találtam albumint. Habár a könyvtárkészítést az albumindepletált átfolyó frakcióval folytattam tovább, a másik két frakciót is megőriztem (-70 °C-on) arra az esetre, ha a bennük található fehérjékre szükség lenne későbbi vizsgálatokhoz. A 2. ábra mutatja a lépés egy jellemző kromatogramját, a három csúcs időrendben (1) az albumindepletált átfolyó frakciót, (2) eluált albumint és (3) regenerálási frakciót reprezentálja.

A 3. ábrán a Blue Sepharose-kromatográfiás lépés során kapott frakciók SDS-PAGE analízisének eredménye látható. A molekulasúly-marker (M, a számok kDa-ban mutatják a fehérjék molekulatömegét) melletti 1. oszlop a depletálás előtti plazma elektroforetikus elválasztása, ezt követi az albumindepletált átfolyó frakcióé (2.), az eluált albuminfrakcióé (3.) és a regenerálási frakcióé (4.). Az átfolyó frakció kivételével minden frakcióban domináns az albumin fehérjesávja (kb. 67 kDa, nyilakkal jelölve).



2. ábra: Az albumindepletálási lépés egy reprezentatív kromatogramja. A csúcsok időrendben: albumindepletált átfolyó frakció (1.), eluált albuminfrakció (2.), regenerálási frakció (3.). A függőleges piros vonalak a frakcióhatárok. Elválasztási körülmények: oszlop: XK 26/40, állófázis: Blue Sepharose 6 Fast Flow, injektálás: 25 ml plazma, futtatópuffer: PBS (pH: 7,4), áramlási sebesség: 2 ml/perc, albumin eluálása: 1 M KCl, regenerálás: 8 M guanidin-hidroklorid.

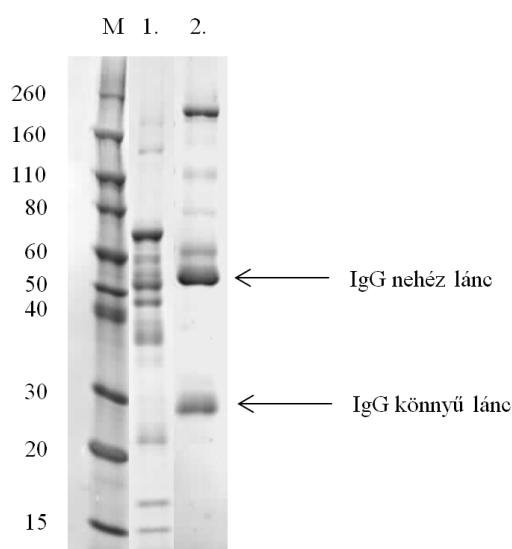


3. ábra: Az albumindepletálás során kapott frakciók elektroforetikus képe. 1.: kiindulási, depletálatlan plazma, 2.: albumindepletált átfolyó frakció, 3.: eluált albuminfrakció, 4.: regenerálási frakció, M: molekulásúly-marker. A nyilak az 1., 2. és 3. frakcióban dominánsan jelenlévő albumin fehérjesávjaira mutatnak.

5.1.2. Immunglobulin-depletálás

Az Analitkönyvtár készítésének következő lépése a plazma második legnagyobb mennyiségben jelenlévő komponenscsoportjának, az immunglobulinoknak a depletálása

volt tiofil interakciós kromatográfiával. Egy kísérlet alkalmával egy egyedi Blue Sepharose-kromatográfiás lépés során kapott átfolyó frakcióban (135-160 ml) lévő immunglobulinokat kötöttem meg tiofil adszorbens gyöngyökkel (éjszakán át tartó kevertetés hidegszobában, 0,5 M kálium-szulfát jelenlétében). Az adszorbens leüleptítése (gravitációs oszlopban) utáni átfolyó és az első két kálium-szulfátos mosási frakciót gyűjtöttem össze további frakcionálás céljából. Az immunglobulinokat eluáltam az oszlopról (50 mM nátrium-foszfáttal, pH 8,0), és az oszlopot 8 M guanidin-hidrokloriddal regeneráltam. A munkafázis után kb. 3,6 liter feldolgozandó albumin- és immunglobulin-depletált átfolyó frakció állt rendelkezésemre, de a kb. 5 liter térfogatú, immunglobulinokat tartalmazó eluátumot is összegyűjtöttem és tároltam további vizsgálatokhoz. Az 4. ábra az albumin- és immunglobulin-depletált plazma (1.) és az eluált immunglobulinfrakció (2.) SDS-PAGE-képét mutatja. Látható, hogy amíg a depletált frakcióban az IgG kb. 50 kDa-os nehéz- és kb. 25 kDa-os könnyűláncának mennyisége szignifikánsan lecsökkent, addig ez a két fehérjesáv az eluátumban jelent meg (nyilakkal jelölve). A nagyobb molekulásúly-tartományban nagy valószínűséggel monomer IgM-molekulák (180 kDa) és nem redukált IgG-k voltak.



4. ábra: Az immunglobulin-depletálás során kapott frakciók elektroforetikus képe. 1.: albumin- és immunglobulin-depletált plazma, 2.: eluált immunglobulinok, M: molekulásúly-marker. A nyilak az IgG molekulák nehéz és könnyű láncainak megfelelő fehérjesávokra mutatnak.

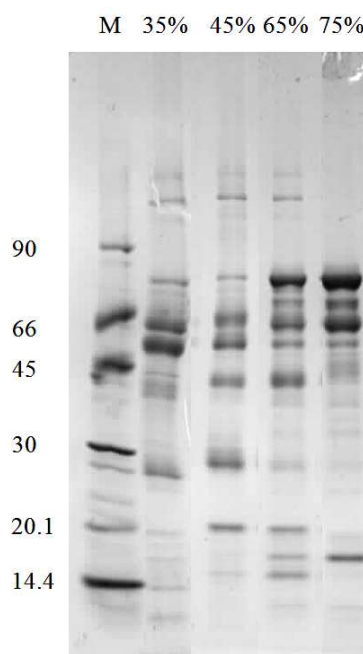
5.1.3. A depletált plazma töményítése és puffercseréje

A kb. 3,6 liter albumin- és immunglobulin-depletált plazma térfogata a koncentrálatási lépés eredményeképpen 290 ml-re csökkent, ami nagyjából 12,5-szeres töményítésnek

felelt meg. A kálium-szulfát eltávolítására és a plazmafehérjéket tartalmazó puffer 7,4-es pH-jú PBS-re cserélésére szolgáló dialízis – melyet 10 kDa pórusméretű dialízismembránnal végeztem 24 órán át, hidegszobában (4 °C) – után az oldat térfogata 335 ml-re nőtt.

5.1.4. A depletált, dializált plazma előfrakcionálása kisózással

A 35, 45, 65 és 75%-os telítettségű ammónium-szulfátos kisózás után az albumin- és immunglobulin-depletált plazma 5 frakcióra vált szét, a 4 csapadék PBS-ben oldásával kapott oldatokra és a 75%-os kisózás után visszamaradt felülúszóra. A frakciók összetételét SDS-PAGE-vel elemeztem, és bár a szomszédos frakciókban láthatók voltak bizonyos mértékű átfedések, az előfrakcionálás során különváltak a különböző hidrofób tulajdonságokkal rendelkező plazmafehérjék. A 75%-os kisózás után visszamaradt felülúszó nem tartalmazott detektálható fehérjét, így ezt a továbbiakban nem dolgoztam fel. Az ammónium-kisózással kapott frakciók SDS-PAGE képe az 5. ábrán látható.

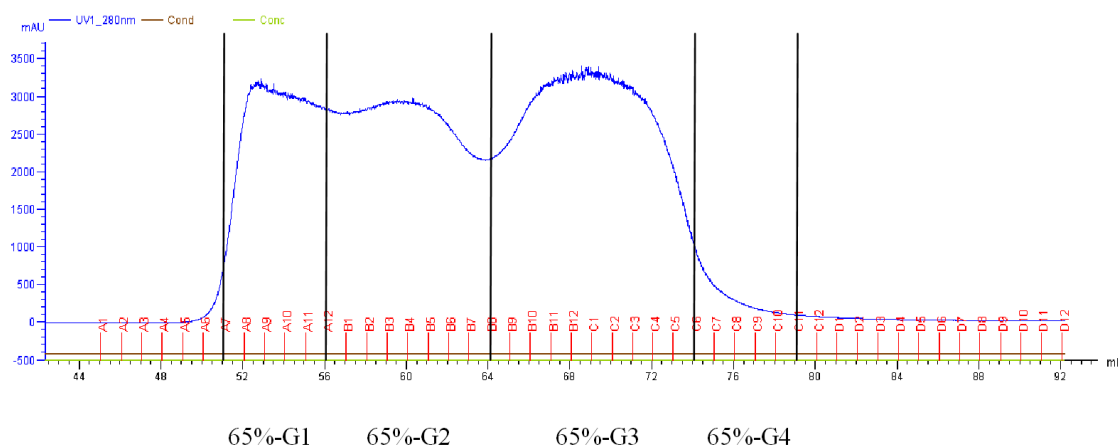


5. ábra: Az ammónium-szulfátos kisózással kapott frakció elektroforetikus képe. M: molekulásúly-marker

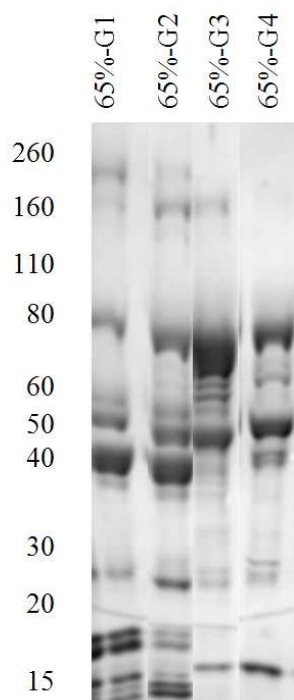
5.1.5. Méretkizárásos kromatográfia

A kisózással nyert 4 frakciót (35, 45, 65 és 75%-os) méretkizárásos kromatográfiával (géliszűrőssel) frakcionáltam tovább, mely lépés egyúttal sómentesítést is jelentett, mivel az ammónium-szulfát az utolsó fehérjefrakciót követően távozott az oszlopról. A gyűjtött frakciókat SDS-PAGE-vel elemeztem, és a hasonló elektroforetikus mintázatot – azonos mérettartományba eső fehérjesávok száma és az azonos méretű fehérjék mennyisége – mutató frakciókat egyesítettem. A méretkizárásos kromatográfiás elválasztás eredményeképpen 14 frakciót kaptam: 3–3 származott a 35 és 45%-os, míg 4–4 a 65 és 75%-os ammónium-szulfát-precipitátumokból.

A 6. ábra egy jellemző lefutású kromatogramon mutatja be a 65%-os ammónium-szulfát-precipitátum elválasztását (kék vonal). A frakciók határait piros vonalak jelzik. A függőleges fekete vonalak által közrefogott frakciókat egyesítettem. A 7. ábrán az egyesített frakciók SDS-poliakrilamid-gélelektroforetikus elemzésének eredménye látható.



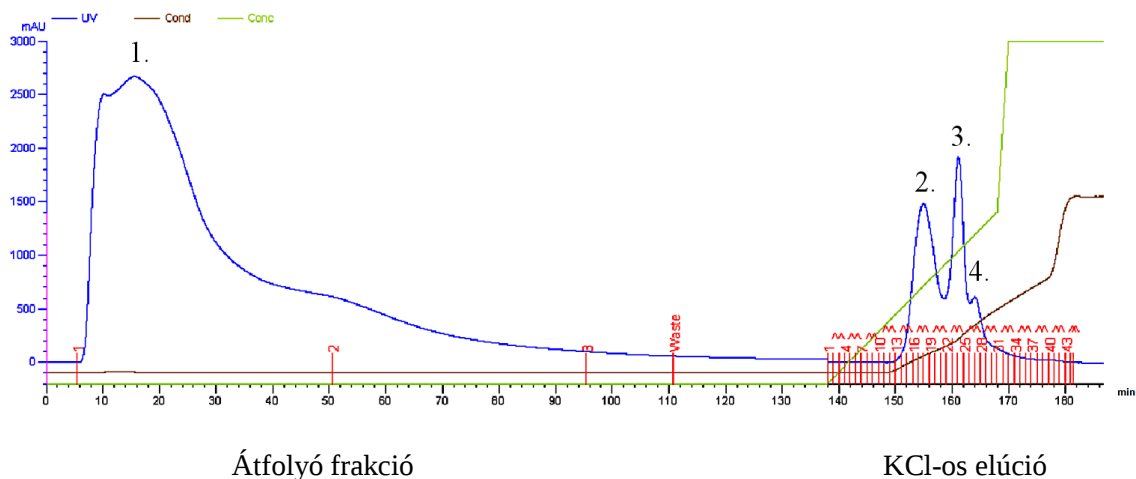
6. ábra: A 65%-os ammónium-szulfát-precipitátum méretkizárásos kromatográfiás frakcionálásának kromatogramja. A piros vonalak a frakcióhatárok. A fekete vonalak által közrefogott frakciókat egyesítettem.



7. ábra: A 65%-os ammónium-szulfát-precipitátum méretkizárásos kromatográfiás elválasztása során gyűjtött hasonló profilú frakciók egyesítése után kapott 65%-G1-G4 frakciók SDS-PAGE analízise.

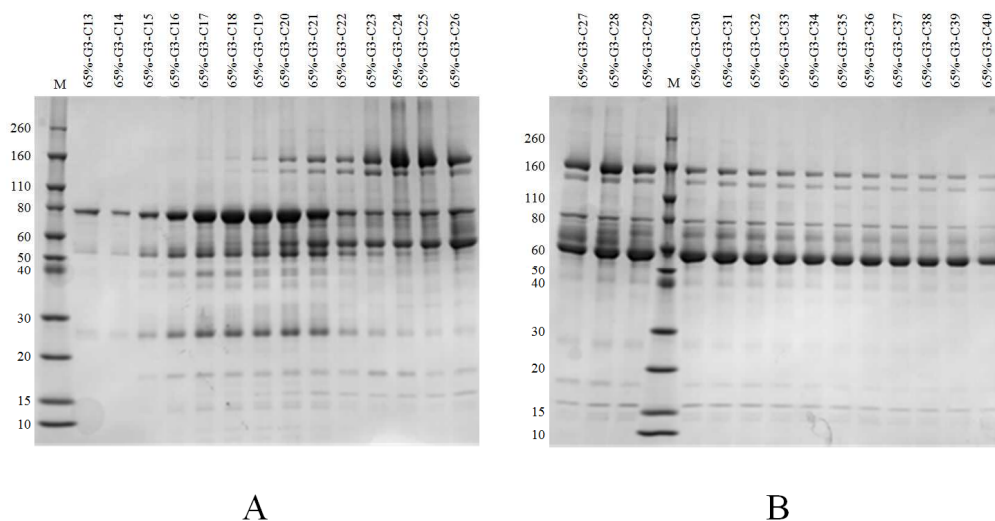
5.1.6. Kationcserés kromatográfia

A 14 gélszűrőssel nyert frakciót kationcserés elválasztásnak vetettem alá. Az átfolyó frakciókat összegyűjtöttem, az oszlophoz kötődött fehérjéket pedig lineárisan növekvő kálium-klorid-gradienssel eluáltam. A 8. ábra egy, a kationcserére jellemző lefutású kromatogramon mutatja be a 65%-os ammónium-szulfát-precipitátum gélszűrőssel kapott 3. frakciójának (65%-G3) elválasztását (kék vonal). A barna vonal a vezetőképesség, míg a zöld az elúciós puffer koncentrációjának változását ábrázolja. A kromatogram első csúcsa az összes oszlopra nem kötődött fehérjét tartalmazó átfolyó frakciót reprezentálja (5–110. perc). A frakciószedést a KCl-gradiens kezdetén (138. perc) indítottam, 1 ml-es frakciókat gyűjtöttem, és a 182. perc után állítottam le. A frakciók határait a függőleges piros vonalak jelzik. A kationcsere 322 frakciót eredményezett, melyek már végleges Analitkönyvtár-frakcióknak voltak tekinthetők.



8. ábra: A 65%-G3 frakció (a 65%-os ammónium-szulfát-precipitátum gélzűrőssel kapott 3. frakciója) kationcserés elválasztásának kromatogramja. A csúcsok időrendben (balról jobbra): átfolyó frakció (1.), a KCl-os elúcióval kapott fehérjék (2-4.). A függőleges piros vonalak a frakcióhatárok. Elválasztási körülmények: oszlop: HiTrap SP HP, futtatópuffer: 50 mM foszfátpuffer (pH: 5,5), áramlási sebesség: 1 ml/perc, elúció: 0-0,5 M KCl 50 mM foszfátpufferben (pH: 5,5) oldva.

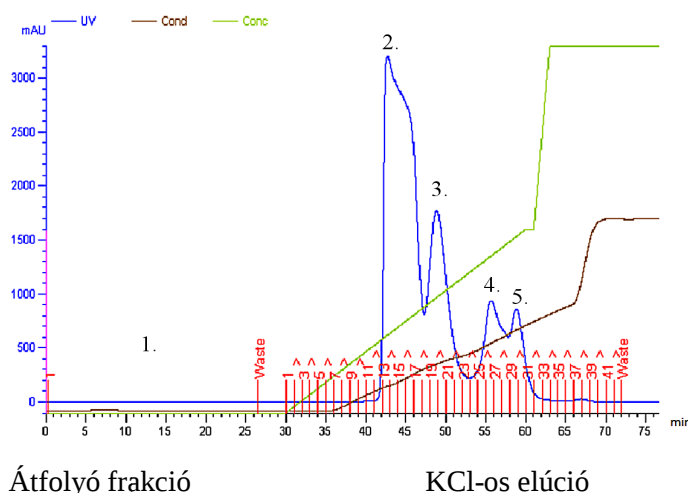
A 9. ábra a 65%-G3 frakció kationcserés szeparálása után kapott, fehérjét tartalmazó frakcióinak SDS-PAGE elválasztásait mutatja. Az ábra A panel részén a 65%-G3-C13–26, míg B részén a 65%-G3-C27–40 referenciakódú frakciók elektroforetikus képei láthatók.



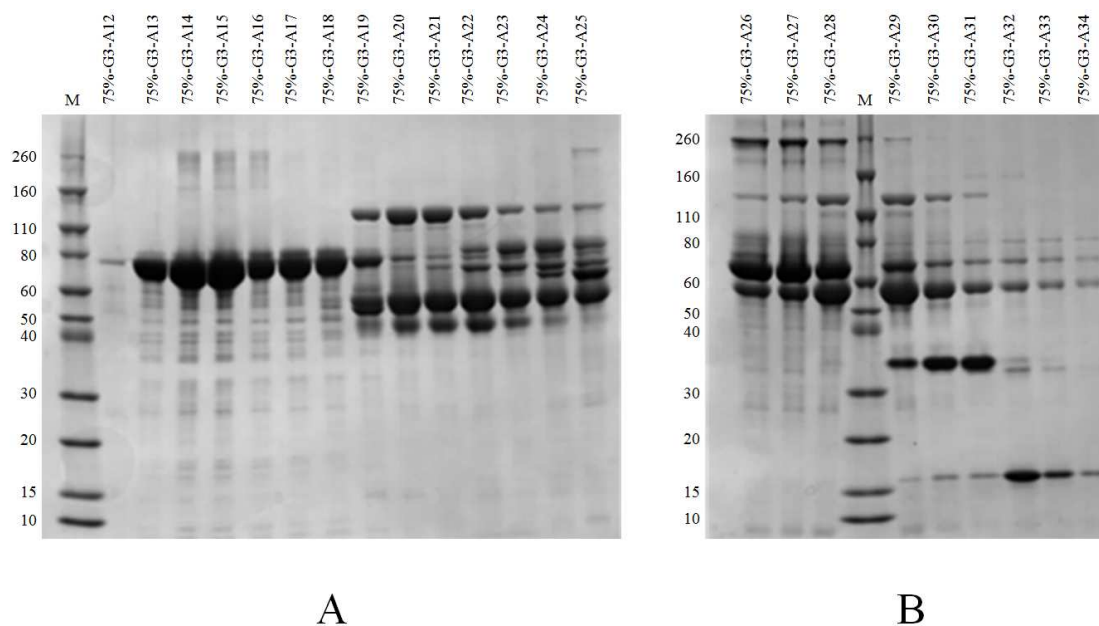
9. ábra: A 65%-G3 frakció kationcserés elválasztása során gyűjtött frakciók SDS-PAGE analízise. A panel: 65%-G3-C13–26 frakciók, B panel: 65%-G3-C27–40 frakciók. M: molekulásúly-marker.

5.1.7. Anioncserés kromatográfia

A kationcserés elválasztások során gyűjtött, az oszlopra nem kötődött fehérjéket tartalmazó átfolyó frakciókat anioncserével frakcionáltam tovább. Az eluálást ebben az esetben is lineárisan növekvő kálium-klorid-gradienssel végeztem. A kationcserés kromatográfiával ellentétben az anioncserés elválasztások esetében az átfolyó frakciók nem tartalmaztak fehérjét, a teljes fehérjemennyiséget megkötötte az oszlop. A 10. ábra a 75%-os ammónium-szulfát-precipitátum géliszűrőssel kapott 3. frakciójának kationcserés szeparálása során felfogott átfolyó frakció (75%-G3-CF) anioncserés elválasztásának kromatogramját ábrázolja (kék vonal). A barna vonal a vezetőképesség, míg a zöld az elúciós puffer koncentrációjának változását követi. 1 ml-es frakciókat gyűjtöttem a 30. perctől (a kálium-klorid-gradiens kezdetétől) a 72. percig. A frakciók határait piros vonalakkal jelölte a szoftver. A 11. ábra a fehérjét tartalmazó eluált frakciók SDS-PAGE analízisének eredményét mutatja. Az ábra A panel részén a 75%-G3-A12–25 referenciakódú frakciók, B panel részén pedig a 75%-G3-A26–34 kódjelűek elektroforetikus elválasztásai láthatók. Általános volt, hogy az elúciós kromatogramokon több csúcsot lehetett megfigyelni, mint kationcsere esetén, az SDS-PAGE képek a kationcseréseknél komplexebb frakciókra engedtek következtetni, és a szomszédos frakciók közötti átfedések kisebb mértékűek voltak. Az anioncsere 316 végső frakciót adott az Analitkönyvtárhoz.



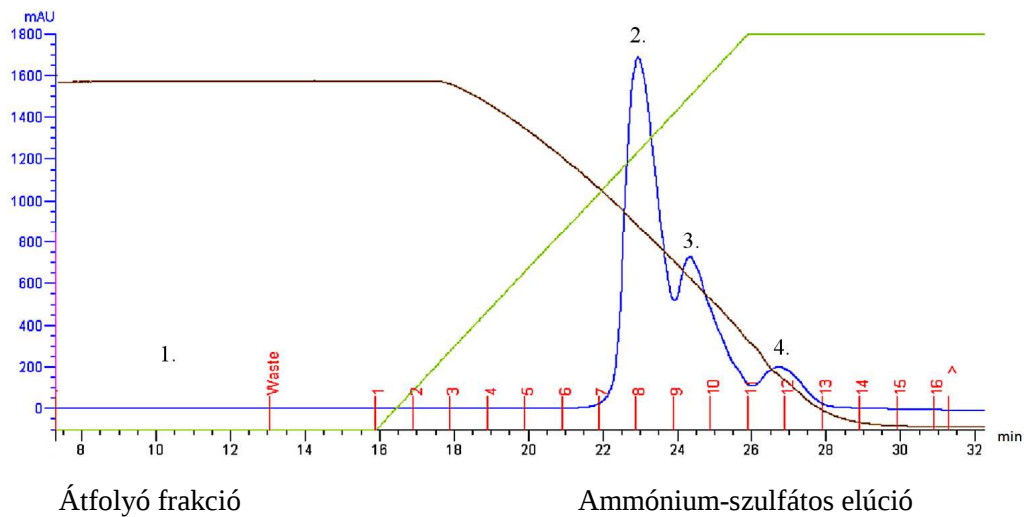
10. ábra: A 75%-G3-CF frakció (a 75%-os ammónium-szulfát-precipitátum géliszűrőssel kapott 3. frakciójának kationcserés szeparálása során gyűjtött átfolyó frakció) anioncserés elválasztásának kromatogramja. Időrendben a következő nagyobb frakciók különböztethetők meg: átfolyó (1.), a KCl-os elúcióval kapott fehérjék (2-5.) A függőleges piros vonalak a frakcióhatárok. Elválasztási körülmények: oszlop: HiTrap Q HP, futtatópuffer: 20 mM TRIS-HCl (pH: 8,5), áramlási sebesség: 1 ml/perc, elúció: 0-0,5 M KCl 20 mM, TRIS-HCl-ben (pH: 8,5) oldva.



11. ábra: A 75%-G3-CF frakció anioncserés elválasztása során gyűjtött frakciók SDS-PAGE analízise. A panel: 75%-G3-A12–25 frakciók, B panel: 75%-G3-A26–34 frakciók. M: molekulásúly-marker.

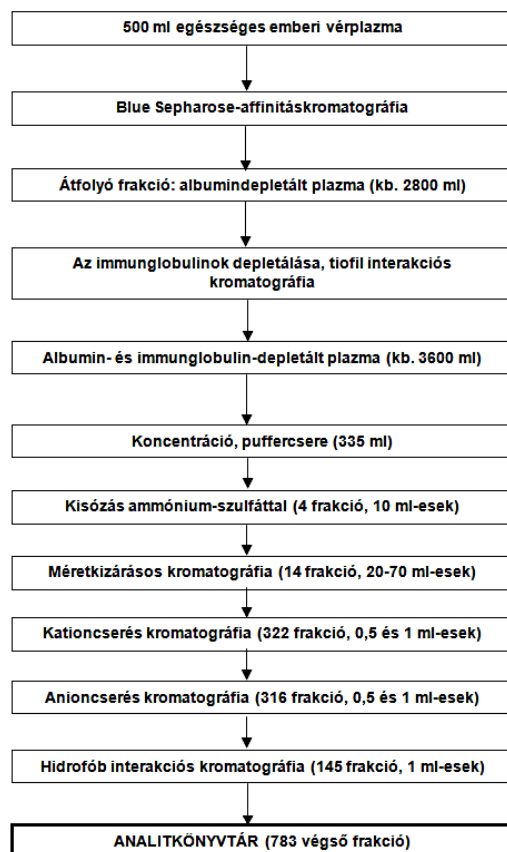
5.1.8. Hidrofób interakciós kromatográfia

A 20 legterményebb (>8,0 mg/ml) ioncserés elválasztás során gyűjtött – mindegyik anioncsere során nyert – kapott frakciót (minden frakció esetében 1 ml-ből 800 µl-t) hidrofób interakciós kromatográfiával frakcionáltam tovább. Kétféle összetételű minta- és eluálópuffert alkalmaztam, melyek a bennük oldott ammónium-szulfát koncentrációjában különböztek. Az oszlopra kötődött fehérjéket lineárisan csökkenő ammónium-szulfát-gradiens alkalmazásával eluáltam, és 1 ml-es frakciókat gyűjtöttem. Az erősebben hidrofób frakciók (45%) elválasztása jobb felbontást eredményezett, mint a kevésbé hidrofóbaké (65 vagy 75%). A 12. ábra a 65%-G3-A17 frakció (65%-os ammónium-szulfátos kicsapás, 3. géliszűrési frakció, 17. anioncserés frakció) hidrofób interakciós kromatográfiás elválasztásának kromatogramját mutatja (kék vonal). A barna vonal a vezetőképesség, a zöld pedig az eluáló puffer koncentrációjának változását szemlélteti. A frakciószedés a 16. és 31. perc között történt, a frakcióhatárokat a függőleges piros vonalak jelzik. Hasonlóan a többi 19 anioncserés frakció szeparálásához, az átfolyó frakció nem tartalmazott fehérjét. A hidrofób interakciós kromatográfia összesen 145 frakciót eredményezett, így alakult ki az Analitkönyvtár 783-as végső frakciószáma.



12. ábra: 65%-G3-A17 frakció (65%-os ammónium-szulfátos kicsapás, 3. géliszűrési frakció, 17. anioncserés frakció) hidrofób interakciós kromatográfiával történt elválasztásának kromatogramja. Időrendben a következő nagyobb frakciók különböztethetők meg: átfolyó frakció (1.), az ammónium-szulfátos elúcióval kapott fehérjék (2-4.). A függőleges piros vonalak a frakcióhatárok. Elválasztási körülmények: oszlop: HiTrap Phenyl Sepharose HP, futtatópuffer: 2 M ammónium-szulfát 20 mM TRIS-HCl-ben (pH: 7,1) oldva, áramlási sebesség: 1 ml/perc, elúció: 2-0 M KCl ammónium-szulfát 20 mM TRIS-HCl-ben (pH: 7,1) oldva.

A 13. ábra foglalja össze az Analitkönyvtár készítésének lépéseit. Az egyes lépések mellett tüntetem fel a kapott frakciók térfogatait.



13. ábra: Az Analitkönyvtár előállításának folyamatábrája. Az egyes lépések mellett a kapott frakciók térfogatai találhatók.

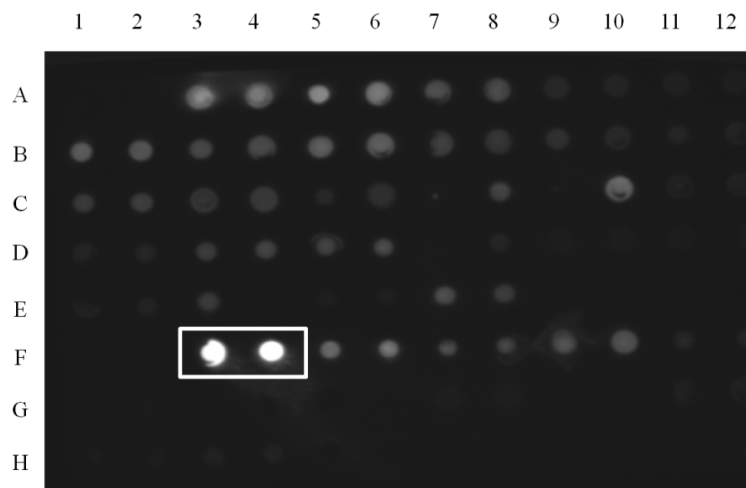
5.2. Az Analitkönyvtár karakterizálása I.: a D vitaminkötő fehérje dúsulási útjának követése a frakcionálás különböző szintjeiben

5.2.1. A D vitaminkötő fehérje dúsulási útjának vizsgálata dot blottal

Az Analitkönyvtár karakterizálásának, egyben alkalmazhatósága megállapításának vizsgálata céljából a D vitaminkötő fehérje (VDBP) szeparációs és dúsulási útjának követésével mutatom be. A kísérletben dot blot módszerrel reagáltattam VDBP-specifikus monoklonális antitestet a könyvtárkészítés összes elválasztási szintjéből szelektált frakciókkal. A D vitaminkötő fehérje a biomarkerkutató egyik jelentős célpontja, és kellően nagy koncentrációban van jelen a plazmában ahhoz, hogy a frakcionálási hierarchia legkomplexebb mintájában (a plazmában) is kimutatható legyen. Az alábbi frakciókat SDS-PAGE analízis alapján meghatározott komplexitásuk és fehérjekoncentrációjuk ($>0,1$ mg/ml) alapján válogattam ki:

- 8 kezdeti szeparációs szintből származó frakció: albumin- és immunglobulin-depletált plazma, a 4 ammónium-szulfát-precipitátum és 3 gélszűréssel kapott frakció (45%-G2, 65%-G2 és 75%-G3),
- 14 kationcserével nyert végső frakció: 35%-G2-C13, 45%-G1-C24, 45%-G2-C11, 45%-G3-C16, 65%-G1-C9, 65%-G1-C23, 65%-G2-C15, 65%-G3-C17, 65%-G4-C16, 75%-G1-C13, 75%-G2-C8, 75%-G3-C19, 75%-G4-C12, 75%-G4-C22,
- 16 anioncserés elválasztás során gyűjtött frakció: 35%-G2-A26, 45%-G1-A21, 45%-G2-A30, 45%-G3-A13, 45%-G3-A25, 65%-G1-A22, 65%-G2-A17, 65%-G2-A22, 65%-G3-A12, 65%-G3-A23, 65%-G4-A11, 75%-G1-A14, 75%-G2-A10, 75%-G3-A26, 75%-G4-A17, 75%-G4-A27,
- 8 hidrofób interakciós kromatográfiával kapott végső frakció: 45%-G2-A21-H8, 65%-G2-A19-H9, 65%-G3-A12-H8, 65%-G3-A17-H10, 75%-G3-A14-H8, 75%-G3-A17-H9, 75%-G4-A15-H9, 75%-G4-A29-H10.

A 14. ábra a kiválasztott könyvtárfrakciók dot blotvizsgálatával kapott membrán képét mutatja. A szignálok a frakciók fehérjei és a monoklonális D vitaminkötő fehérje-specifikus antitest közötti reakciók intenzitását, egyben az antigén eloszlását mutatják a vizsgált frakciókban. A jelintenzitások osztályozása 0 és 5 között történt, 0 értéket azok a frakciók kaptak, melyekben nem lehetett a háttértől nagyobb szignált detektálni. A kezdeti szintekből származó 8 frakció (depletált plazma, ammónium-szulfát-precipitátumok, gélszűrési frakciók) közül 7 adott 1-2-es intenzitású jelet, míg a 38 végső frakció közül 19 produkált többségében 0,5-1-es erősségű szignált, leginkább a 45 és 65%-os ammónium-szulfát-precipitátumok elválasztásával kaptak. Ez a fajta eloszlás arra engedett következtetni, hogy a könyvtárkészítés során a frakciók összetettsége a vártan megfelelően fokozatosan csökkent. A D vitaminkötő fehérje (VDBP) számottevő dúsulását tapasztaltam a 65%-G3-A17-H10 hidrofób interakciós kromatográfiás végső frakcióban, a membrán F3 és F4 pozíciójában (keretesen kiemelve). A jelintenzitásokat itt 5-ösre értékeltem.



14. ábra: A D vitaminkötő fehérje akkumulációjának vizsgálata az Analitkönyvtár 46 frakciójában. Mérési körülmények: fehérjemennyiség/minta: 3 µg, elsődleges ellenanyag: VDBP-specifikus monoklonális antitest (1 µg/ml, 1 óra inkubálás), másodlagos ellenanyag: HRP-konjugált kecske anti-egér IgG (8000-szeres hígítás, 1 óra inkubálás). Előhívás: Pierce ECL Western Blotting Substrate kit, 1 perces expozíció. A minták elhelyezkedése a membránon:

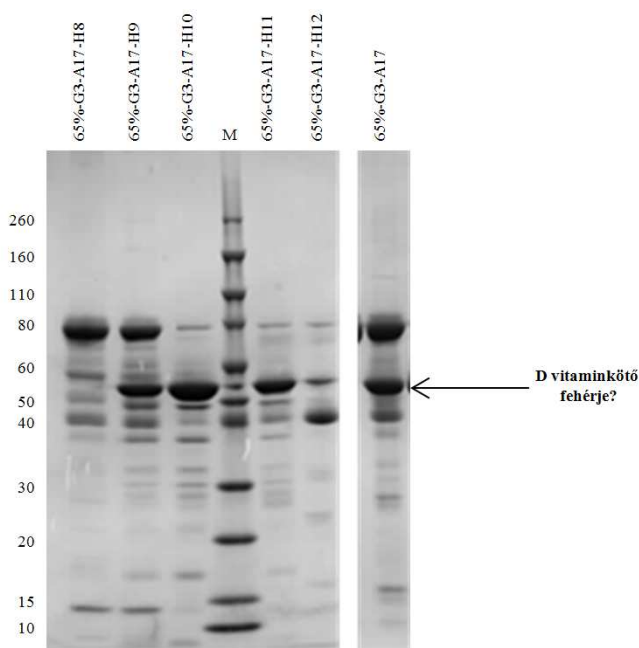
A1-2: negatív kontroll (3 µl blokkoló puffer), A3-4: pozitív kontroll (0,05 µg VDBP-specifikus monoklonális antitest), A5-6: albumin- és immunglobulin-depletált plazma, A7-8: 35%-os ammónium-szulfát-precipitátum, A9-10: 35%-G2-C13, A11-12: 35%-G2-A26,
B1-2: 45%-os ammónium-szulfát-precipitátum, B3-4: 45%-G2, B5-6: 45%-G1-C24, B7-8: 45%-G2-C11, B9-10: 45%-G3-C16, B11-12: 45%-G1-A21,
C1-2: 45%-G2-A30, C3-4: 45%-G3-A13, C5-6: 45%-G3-A25, C7: nincs minta, C8: 45%-G2-A21-H8, C9: nincs minta, C10: 65%-os ammónium-szulfát-precipitátum, C11-12: 65%-G2,
D1-2: 65%-G1-C9, D3-4: 65%-G1-C23, D5-6: 65%-G2-C15, D7: nincs minta, D8: 65%-G3-C17, D9-10: 65%-G4-C16, D11-12: 65%-G1-A22,
E1-2: 65%-G2-A17, E3: 65%-G2-A22, E4: nincs minta, E5-6: 65%-G3-A12, E7-8: 65%-G3-A23, E9-10: 65%-G4-A11, E11-12: 65%-G2-A19-H9,
F1-2: 65%-G3-A12-H8, F3-4: 65%-G3-A17-H10, F5-6: 75%-os ammónium-szulfát-precipitátum, F7-8: 75%-G3, F9-10: 75%-G1-C13, F11-12: 75%-G2-C8,
G1-2: 75%-G3-C19, G3-4: 75%-G4-C12, G5-6: 75%-G4-C22, G7-8: 75%-G1-A14, G9-10: 75%-G2-A10, G11-12: 75%-G3-A26,
H1-2: 75%-G4-A17, H3-4: 75%-G4-A27, H5-6: 75%-G3-A14-H8, H7-8: 75%-G3-A17-H9, H9-10: 75%-G4-A15-H9, H11-12: 75%-G4-A29-H10

A membrán képén kerettel emeltem ki a legintenzívebb jelet adó, 65%-G3-A17-H10 frakciót (F3 és F4 pozíció).

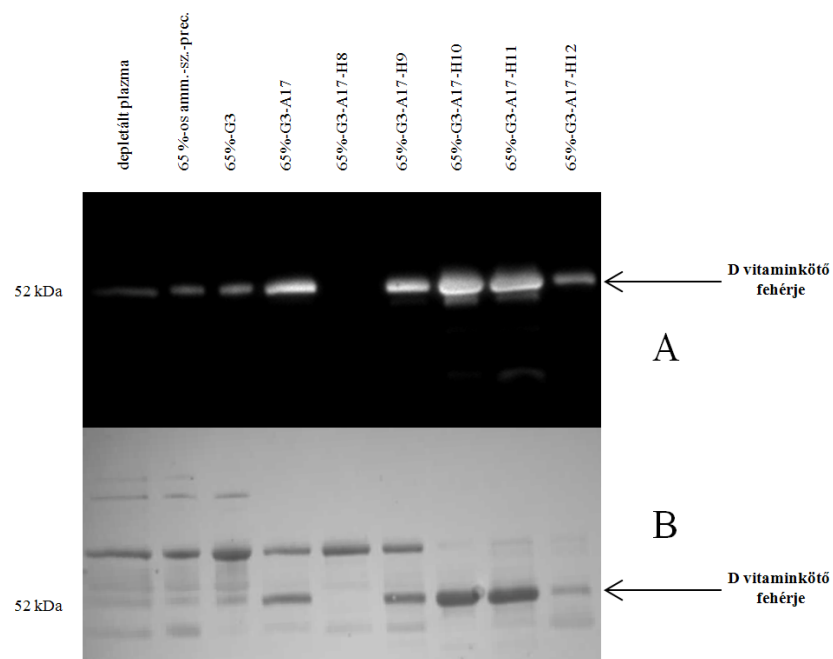
A kísérletet elvégeztem a 2.4. pontban felsorolt fehérjékre specifikus monoklonális antitestekkel is, de az 5.2.1. pontban részletezett frakciószettel nem tapasztaltam a VDBP-hez hasonló közel egyedi dúsulást, így az 5.2.2. pontban leírásra kerülő Western blot vizsgálatokat nem végeztem el velük.

5.2.2. A D vitaminkötő fehérje jelenlétének igazolása Western blottal

A D vitaminkötő fehérje jelenlétének igazolását a 65-G3-A17-H10 frakcióban Western blottal végeztem. A frakció SDS-PAGE-képén (15. ábra) kb. 52 kDa molekulatömegnél elváló erőteljes fehérjesáv (nyíllal jelölve) mérete alapján megfelelt a D vitaminkötő fehérjének, ez azonban még nem volt elegendő bizonyíték arra, hogy valóban a VDBP akkumulációja okozza az erőteljes kemilumineszcens szignált. A 65-G3-A17-H10-en kívül a Western blothoz használtam még a szomszédos frakciókat (65%-G3-A17-H8, 65%-G3-A17-H9, 65%-G3-A17-H11, 65%-G3-A17-H12), az albumin- és immunoglobulin-depletált plazmát, a 65%-os ammónium-szulfát-precipitátumot, a 65%-G3 gélszűrési és a 65%-G3-A17 anioncserés frakciót (16. ábra, A panel). Az antigén dúsulásának folyamata a Western blottal kapott jelek növekvő intenzitása (nyíllal jelölve) alapján jól nyomon követhető. Egyedül a 65%-G3-A17-H8 hidrofób interakciós frakció nem tartalmazta a D vitaminkötő fehérjét, míg a 65%-G3-A17-H9-től -12-ig terjedők igen. A 16. ábra B panel a blotmembrán egy amidofeketével festett részletét ábrázolja, ahol a VDBP-nek feltételezett sáv (52 kDa, nyíllal jelölve) a 9 elemzett frakció közül egyedül a 65%-G3-A17-H8 frakcióban nem látható.



15. ábra: A 65%-G3-A17-H8–12 hidrofób interakciós kromatográfiás frakciók és a 65%-G3-A17 anioncserés frakció SDS-poliakrilamid-gélelektroforetikus képe. Nyíllal jelölve az 52 kDa molekulatömegnél látható erőteljes fehérjesáv, melyről feltételezhető volt (ezt később Western blot kísérlettel is igazoltuk), hogy a D vitaminkötő fehérjét reprezentálja (ahogy a Western blot kísérlettel igazolódott is). M: molekulásúly-marker.



16. ábra: (A) A D vitaminkötő fehérje akkumulációs útjának Western blotképe, (B) A Western blotmembrán amidofeketével festett képe. Nyíllal jelöltem a VDBP-nek megfelelő kemilumineszcens jeleket és fehérjesávokat a Western blot illetve amidofeketével festett képeken.

A Western blot kísérleti körülményei: 2 µg fehérje/minta, elsődleges antitest: D vitaminkötő fehérje-specifikus monoklonális antitest (5000-szeres hígítás, éjszakán át tartó inkubálás), másodlagos antitest: HRP-konjugált kecske anti-egér IgG (5000-szeres hígítás, 1 óra inkubálás). Előhívás: Pierce ECL Western Blotting Substrate kit, 20 másodperces expozíció. Az amidofekete-festés kísérleti körülményei: festőoldat: 10% ecetsavat tartalmazó 0,05%-os amidofekete-oldat, mosás: 2-szer 10 perc 5%-os ecetsavval. Amm.-sz.-prec.: ammónium-szulfát-precipitátum.

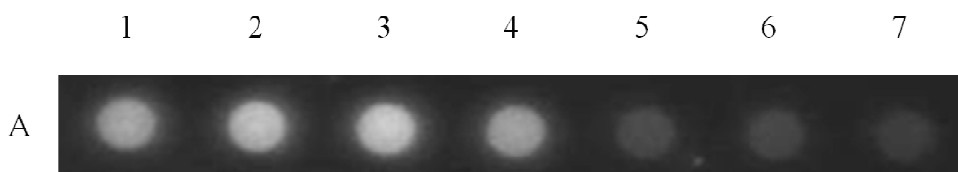
5.3. Az Analitkönyvtár karakterizálása II.: a Könyvtár átfogó szűrése

A Könyvtár átfogó, dot blot szűrését ismert antigén specificitású monoklonális antitestekkel (BioSystems International Kft.) végeztem. A 100 µg/ml-nél nagyobb koncentrációjú frakciók esetében 3 µg-ot vittem fel a nitrocellulóz-membránra, míg a 30-100 µg/ml-es töménységűekből 1 µg-ot. A 30 µg/ml alatti koncentrációjú frakciókat – az elválasztások kezdetén a lassan növekvő abszorbancia vagy a végén az utolsó csúcs ellaposodása során gyűjtött frakciókról van szó – nem használtam, hogy elkerüljem a 30 µl-nél nagyobb mintatérfogatok alkalmazását, melyek meghaladták a membrán folyadékbefogadó képességét a 10 kPa-os szívóerő mellett (azaz szétfolytak). Az átfogó szűréshez így 638 frakció – 244 kationcserés, 273 anioncserés és 121 hidrofób interakciós kromatográfiával kapott – állt rendelkezésemre. Az antitestek kijelölésénél

alapelv volt, hogy az antigén a plazmában kellően nagy mennyiségben legyen jelen, ugyanis a globális eloszlást csak úgy lehet vizsgálni, ha az antigén-antitestreakció eredményeképpen megfelelően erős szignált kapunk. Vizsgálataim során pozitívnak a 3-nál nagyobb erősségű szignált produkáló frakciókat tekintettem. Mindemellett a fehérjék ismert fizikai és biokémiai tulajdonsága (hidrofóbicitás/hidrofilicitás, alak, méret, asszociativitás) is fontos szempont volt a várt és kapott eloszlások összehasonlítása érdekében. Az antigéneket úgy válogattam össze, hogy mindegyike valamilyen betegség vagy patológiás állapot jellemző fehérjéje legyen.

5.3.1. A fibrinogén akkumulációjának vizsgálata

Az Analitkönyvtár kiválasztott frakcióit a fibrinogénspecifikus ellenanyaggal szűrve az antigén dúsulását kizárólag a 35%-os ammónium-szulfát-precipitátumból származó és a méretkizárásos kromatográfia során az első eluátum (35%-G1, legnagyobb méretűek) elválasztásával nyert kationcserés frakciókban tapasztaltam. A 17. ábra a fibrinogénspecifikus antitesttel végzett szűrés eredményét mutatja a dot blotmembrán kiemelt részletén. A frakciókból 1 µg-okat cseppentettem fel a membrán megfelelő pozícióiba (A1-től A7-ig). Az antigén az A1–A4 mintahelyeken lévő 35%-G1-C13, -15, -16 és -21 frakciókban dúsult a legnagyobb mértékben. A 18. ábra végig követi a frakcionálás különböző szintjeit az ammónium-szulfátos kicsapástól (Amm.-sz.) a méretkizárásos (Méretkiz. kr.), kationcserés és anioncserés kromatográfián át a hidrofób interakciós kromatográfiáig. A sötétszürke téglalapok a pozitív (jelintenzitás > 3) végső frakciókat illusztrálják, míg az üres négyszögek által reprezentált frakciók nem adtak 3-nál nagyobb intenzitású szignált a fibrinogénspecifikus antitesttel.



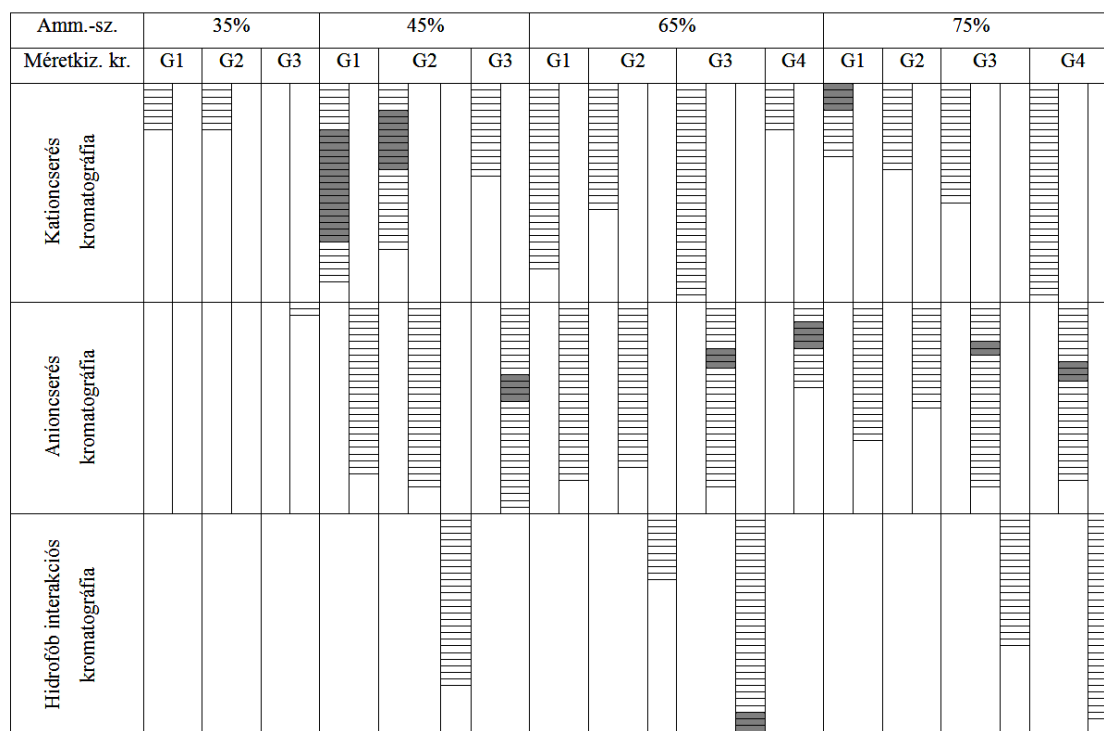
17. ábra: A fibrinogén akkumulációja az Analitkönyvtár 35%-G1 kationcserés frakcióiban. A1: 35%-G1-C13, A2: 35%-G1-C15, A3: 35%-G1-C16, A4: 35%-G1-C21, A5: 35%-G1-C22, A6: 35%-G1-C23, A7: 35%-G1-C24. Mérési körülmények: fehérjemennyiség/minta: 1 µg, elsődleges ellenanyag: fibrinogénspecifikus monoklonális antitest (1 µg/ml, 1 óra inkubálás), másodlagos ellenanyag: HRP-konjugált kecske anti-egér IgG (8000-szeres hígítás, 1 óra inkubálás). Előhívás: Pierce ECL Western Blotting Substrate kit, 116 másodperces expozíció.

Amm.-sz.	35%			45%			65%				75%			
Méretkiz. kr.	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
Kationcserés kromatográfia														
Anioncserés kromatográfia														
Hidrofób interakciós kromatográfia														

18. ábra: A fibrinogén eloszlása az Analitkönyvtárban. Amm.-sz.: ammónium-szulfátos kisózás, Méretkiz. kr.: méretkizárásos kromatográfia. A sötétszürke téglalapok a pozitív (jelintenzitás > 3) végső frakciókat jelzik.

5.3.2. A D vitaminkötő fehérje akkumulációjának vizsgálata

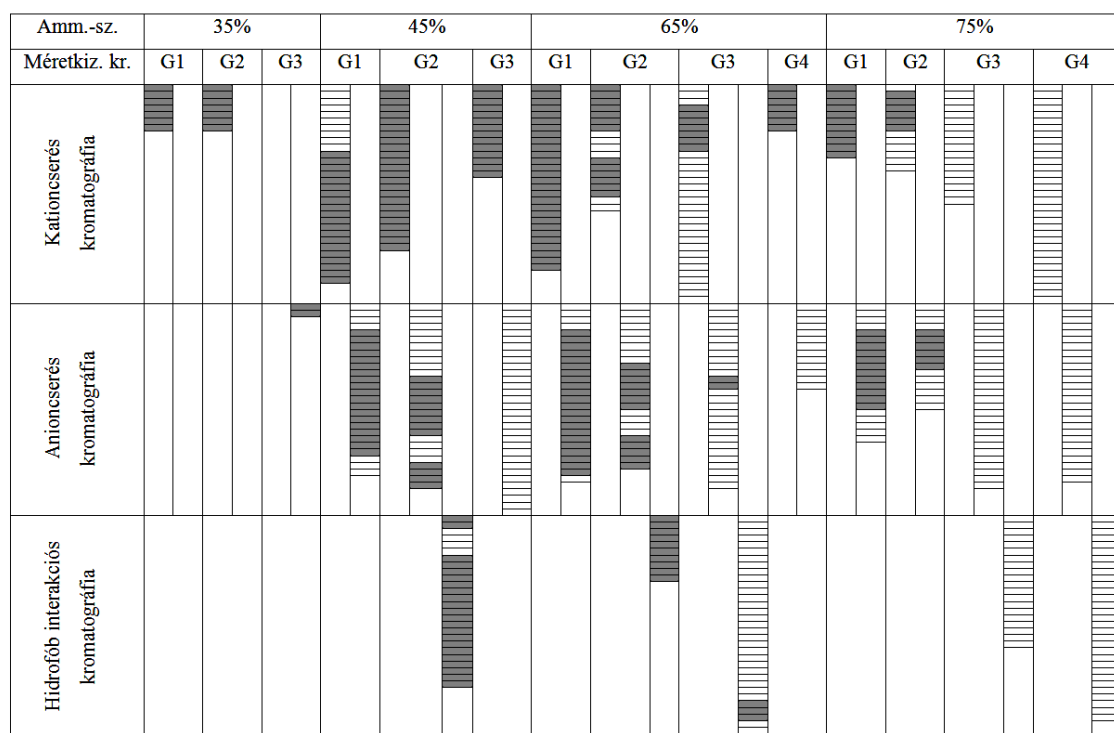
A 5.2. fejezetben leírt dot blot- és Western blotvizsgálatok során talált, erősen pozitív jeleket adó frakciókon kívül az antigén ugyancsak 5-ös jelintenzitást mutatott több, anioncserével kapott szomszédos végső Analitkönyvtár frakcióban, úgymint a 45%-G3-A20–22, 65%-G4-A13 és -14, valamint a 75%-G4-A18–20 referencia-kódúakban. A felsorolt frakciók az alacsonyabb molekulaméretű fehérjéket reprezentálják (G3, G4), és csak 35%-os ammónium-szulfát-precipitátumok szeparálásával nyert frakciók nem találhatók köztük. A fentieknél gyengébb, de pozitív jeleket figyeltem meg a 45%-os ammónium-szulfát-precipitátum kationcserével kapott végső frakcióiban, az előzőekkel ellentétben azonban a nagy és közepes (G1 és G2) molekulaméret tartományúakban. Az D vitaminkötő fehérje-specifikus monoklonális ellenanyaggal végzett vizsgálat során 3-as értéknél nagyobb jelintenzitást mutató frakciók láthatók a 19. ábrán, sötétszürke téglalapokkal jelölve.



19. ábra: A D vitaminkötő fehérje eloszlása az Analitkönyvtárban. Amm.-sz.: ammónium-szulfátos kisózás, Méretkiz. kr.: méretkizárásos kromatográfia. A sötétszürke téglalapok a pozitív (jelintenzitás > 3) végső frakciókat jelzik.

5.3.3. A haptoglobin akkumulációjának vizsgálata

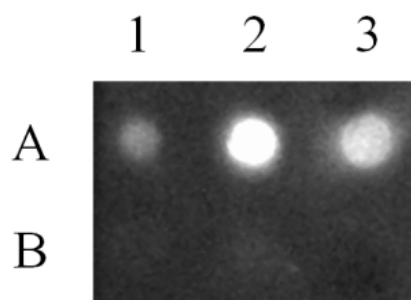
A fibrinogén és a D vitaminkötő fehérje akkumulációjával szemben a haptoglobin eloszlása teljesen más mintázatot eredményezett. A haptoglobinspecifikus monoklonális antitest a vizsgált Analitkönyvtár frakciók 42%-ával adott pozitívnak értékelhető kemilumineszcens jelet. Ez az arány a fibrinogén és a VDBP esetében kb. 0,6 illetve 7,8% volt. Ebből azt a következtetést vontam le, hogy ez a fehérje szétterült a teljes Könyvtárban, ami arra utal, hogy a fehérje különböző izoformáit mutattam ki. Az antigén detektálható volt mind a négy ammónium-szulfát-precipitátum további szeparálásával kapott végső frakciókban, mind a kationcserés, anioncserés és hidrofób interakciós kromatográfiával nyertek között. Jelenléte csak a 45%-G3 és 65%-G4 anioncserés elválasztásával, valamint a 75%-G3 és 75%-G4 szeparálásával kapott végső frakciókban nem volt kimutatható. A haptoglobinspecifikus monoklonális ellenanyaggal végzett vizsgálat eredménye a 20. ábrán látható, sötétszürke téglalapokkal jelöltem a 3-as értéknél nagyobb jelintenzitást mutató frakciókat.



20. ábra: A haptoglobin eloszlása az Analitkönyvtárban. Amm.-sz.: ammónium-szulfátos kisózás, Méretkiz. kr.: méretkizárásos kromatográfia. A sötétszürke téglalapok a pozitív (jelintenzitás > 3) végső frakciókat jelzik.

5.3.4. A C9 komplement komponens akkumulációjának vizsgálata

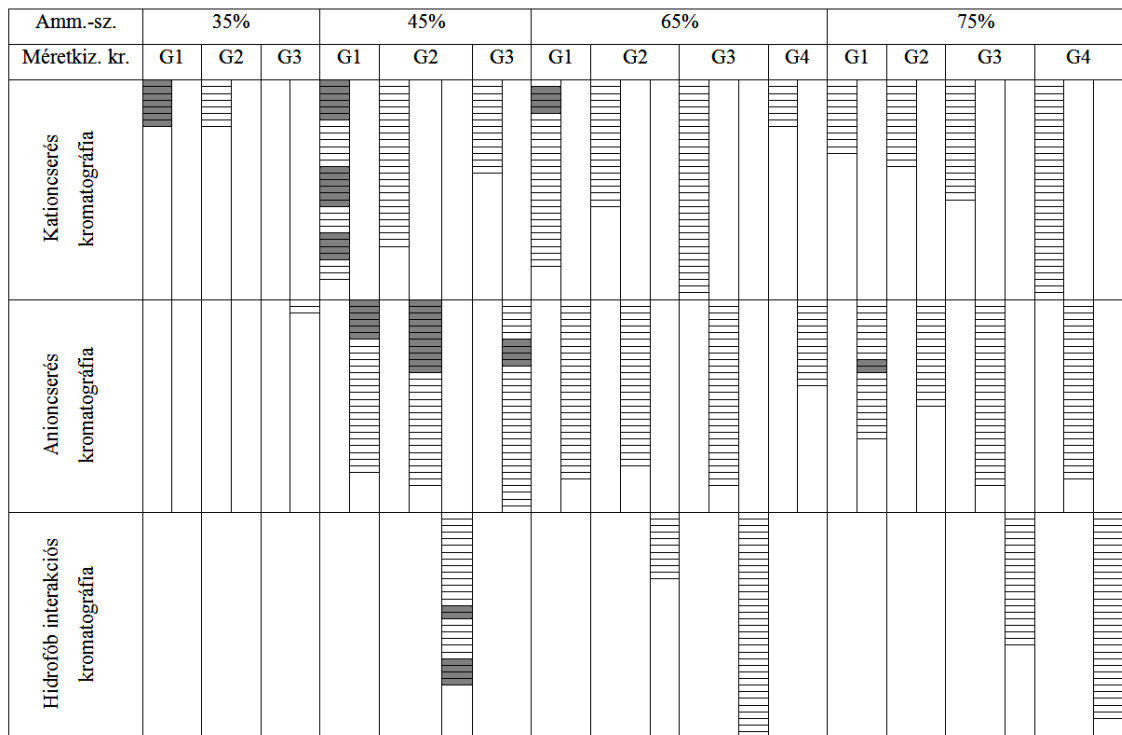
A C9 komplement komponens elleni monoklonális ellenanyaggal lefolytatott szűrés egy újabb típusú eredményt hozott, ugyanis egyik végső Analitkönyvtár frakció esetében sem kaptam értékelhető szignált. Feltételeztem, hogy a fehérje a könyvtárkészítés kezdeti fázisaiban kapott bizonyos frakciókban lehet jelen. Ennek igazolására dot blotvizsgálatot végeztem, melynek során 3 µg-okat vittem fel a membránra a következő, a frakcionálás korábbi szintjeiből származó frakciókból: (1) albumindepletált plazma, (2) kálium-kloriddal eluált albuminfrakció, (3) a Blue Sepharose-oszlop regenerálásával kapott frakció, (4) albumin- és immunglobulin-depletált plazma és (5) a tiofil oszlop (immunglobulin-depletálás) első mosási frakciója. Az antitest erős pozitív reakciót mutatott a KCl-os elúcióval kapott albuminfrakcióval (5-ös erősség) és kevésbé kifejezettet a regenerálási frakcióval (3-as erősség). A többi 3 frakcióban a jelintenzitás nem érte el a 3-at. A membrán képe a 21. ábrán látható.



21. ábra: A C9 komplement komponens jelenlétének vizsgálata a Könyvtár készítésének kezdeti fázisaiban kapott frakciókban. A1: albumindepletált plazma, A2: eluált albuminfrakció, A3: a Blue Sepharose-oszlop regenerálási frakciója, B1: albumin- és immunglobulin-depletált plazma, B2: a tiofil oszlop (immunglobulin-depletálás) első mosásával kapott frakció. Mérési körülmények: fehérjemennyiség/minta: 3 μ g, elsődleges ellenanyag: C9 komplement komponens-specifikus monoklonális antitest (1 μ g/ml, 1 óra inkubálás), másodlagos ellenanyag: HRP-konjugált kecske anti-egér IgG (8000-szeres hígítás, 1 óra inkubálás). Előhívás: Pierce ECL Western Blotting Substrate kit, 60 másodperces expozíció.

5.3.5. Az alfa-2-makroglobulin akkumulációjának vizsgálata

Az alfa-2-makroglobulin-specifikus monoklonális ellenanyaggal végzett átfogó vizsgálat eredményeképpen kiemelkedő erősségű pozitív szignálokat javarészt a 35 és 45%-os ammónium-szulfát-precipitátumok szeparálásával kapott frakciókban kaptam, azon belül is a legnagyobb molekulatömegű méretkizárásos kromatográfiás (G1) frakciókban. Kisebb erősségű, kevés (6) frakcióra kiterjedő pozitivitást tapasztaltam még a 65 és 75%-os precipitátumok további frakcionálásával nyert frakciókban, hasonlóan a legnagyobb mérettartományban, valamint a 45%-G2 és 45%-G3 anioncserés és hidrofób interakciós kromatográfiás elválasztása során gyűjtött frakciókban. Az alfa-2-makroglobulin eloszlását a 22. ábra szemlélteti.



22. ábra: Az alfa-2-makroglobulin eloszlása az Analitkönyvtárban. Amm.-sz.: ammónium-szulfátos kisózás, Méretkiz. kr.: méretkizárásos kromatográfia. A sötétszürke téglalapok a pozitív (jelintenzitás > 3) végső frakciókat jelzik.

5.3.6. A hemopexin akkumulációjának vizsgálata

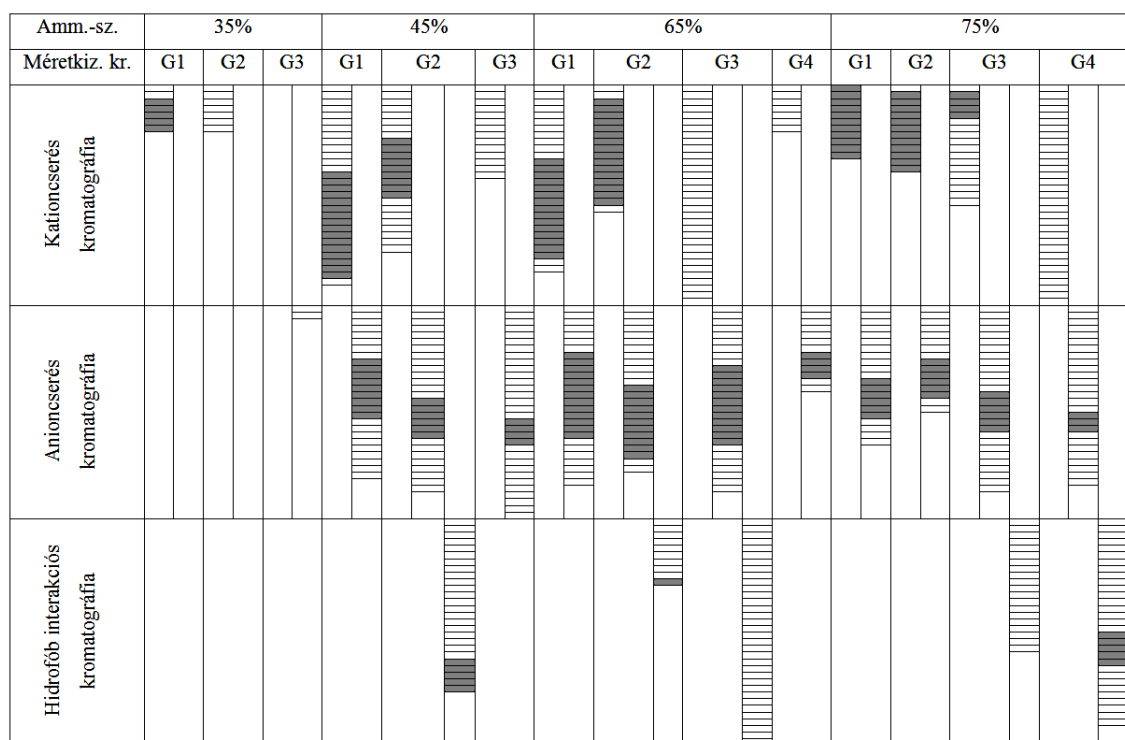
A hemopexint túlnyomó többségben (a pozitív frakciók 83%-ában) olyan frakciókban mutattam ki, melyeket a 45%-os ammónium-szulfát-precipitátum anioncserés elválasztásával kaptam, és pozitívnak értékelhető jelet mindhárom (G1-G3) mérettartományban tapasztaltam. A 45%-G3 kationcserés frakciók közül 3-ban, míg a 65%-G2 anioncserések közül 2-ben láttam gyengébb pozitív szignált. A 35 és 75%-os ammónium-szulfát-precipitátumok szeparációjával nyert és a hidrofób interakciós kromatográfias frakcióban az antigént nem lehetett detektálni. A hemopexin akkumulációját az Analitkönyvtárban a 23. ábrán mutatom be.

Amm.-sz.	35%			45%			65%				75%			
Méretkiz. kr.	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
Kationcserés kromatográfia														
Anioncserés kromatográfia														
Hidrofób interakciós kromatográfia														

23. ábra: A hemopexin eloszlása az Analitkönyvtárban. Amm.-sz.: ammónium-szulfátos kisózás, Méretkiz. kr.: méretkizárásos kromatográfia. A sötétszürke téglalapok a pozitív (jelintenzitás > 3) végső frakciókat jelzik.

5.3.7. Az albuminspecifikus antitesttel végzett szűrés eredményei

Az albuminspecifikus monoklonális ellenanyaggal kivitelezett szűrés egyik célja az volt, hogy megvizsgáljam, hogy a Könyvtár frakcióiban a Blue Sepharose-kromatográfia után talál-e oszlopra nem kötődött albumint. A vártakkal ellentétben nem csak néhány frakcióban, hanem a frakciók igen nagy részében (28%) kaptam pozitívnak értékelhető jelet, eloszlásuk pedig a haptoglobin esetében tapasztaltnál hasonló nagyfokú szétterülést mutatott. Detektálható volt szignál mind a 4 ammónium-szulfát-precipitátum további szeparálásával kapott végső frakciókban és mindhárom szeparációs szinten (kationcserés, anioncserés, hidrofób interakciós kromatográfia). Az albuminspecifikus antitesttel végzett szűrés eredményeit, az antigén szétterjedését a 24. ábra mutatja be.



24. ábra: Az albuminspecifikus ellenanyaggal pozitív jelet adó frakciók eloszlása az Analitkönyvtárban. Amm.-sz.: ammónium-szulfátos kisózás, Méretkiz. kr.: méretkizárásos kromatográfia. A sötétszürke téglalapok a pozitív (jelintenzitás > 3) végső frakciókat jelzik.

5.4. Az Analitkönyvtár felhasználása monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosításra

A monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosításhoz az 5.3. pontban részletezett átfogó szűrésekhez kiválasztott 638 (244 kationcserés, 273 anioncserés és 121 hidrofób interakciós kromatográfiával kapott) frakciót – amelyeknek a koncentrációja 30 µg/ml fölött volt – használtam. Első lépésben ezt a 638 frakciót dot blot módszerrel reagáltattam három olyan monoklonális ellenanyag-keverékkel, melyekben az antitestek antigénjei ismeretlenek voltak. Az antitest-keverékek használata lehetővé tette, hogy a szűrés első, átfogó fázisában ne kelljen több alkalommal végigszűrni a teljes Analitkönyvtárat, ezáltal a kísérlet mind anyag-, mind munkaigényét csökkenteni tudtam. A szűrés első fázisa után kiválogattam a pozitív frakciókat, majd a vizsgálat következő szakaszában a keverékben található egyedi ellenanyagokkal reagáltattam őket, ugyancsak dot blottal. A második szűrés után a legintenzívebb szignálokat produkáló frakciókat választottam ki immunprecipitációra és Western blot analízisre. Az immunprecipitációs és Western blot vizsgálatok

eredményének függvényében kerültek az immunprecipitációs kísérletek során kapott eluátumok vagy kivágott fehérjefragmentek tömegspektrometriás elemzésre.

Az azonosítási folyamat lépéseit a Bsi0144-es és Bsi0051-es számú antitestek példáin mutatom be részletesen.

5.4.1. A Bsi0144-es antitesthez tartozó antigén azonosítása

5.4.1.1. A Bsi0144-es antitestet tartalmazó keverék vizsgálata dot blottal

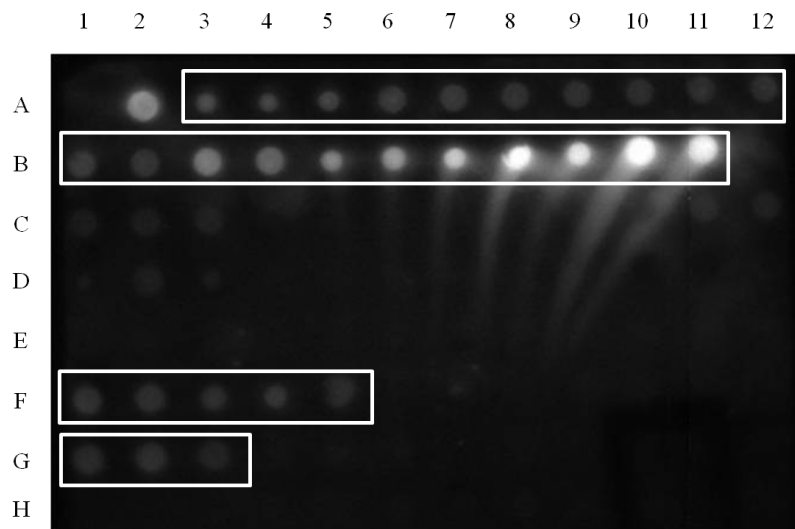
Az antigénazonosítási munkaszakasz Bsi0144-es ellenanyagot is tartalmazó antitestkeveréke a következő monoklonális ellenanyagokból állt: Bsi0112, Bsi0115, Bsi0142, Bsi0144, Bsi0180, Bsi0601, Bsi0695, Bsi0940, Bsi1487, Bsi2558. A 638 frakciót dot blot módszer segítségével reagáltattam az antitestkeverékkel – az egyes ellenanyagok koncentrációja 1 µg/ml volt az elegyben –, másodlagos antitestként 8000-szeresre hígított HRP-konjugált kecske-anti-egér IgG-t használtam. Az antigén-antitestreakció detektálására a felerősített kemilumineszcencia elvén működő Pierce ECL Western Blotting Substrate kitet használtam. A jeleket 0 és 5 között értékeltem. A 3-nál nagyobb szignálintenzitást produkáló 57 frakciót kiválasztottam a vizsgálat következő lépéséhez.

Az anyagfelhasználás további csökkentése érdekében az antitestkeveréket 3 részre osztottam, melyek az alábbi összetételűek voltak:

- 1. alkeverék: Bsi0112, Bsi0115, Bsi0142
- 2. alkeverék: Bsi0144, Bsi0180, Bsi0601
- 3. alkeverék: Bsi0695, Bsi0940, Bsi1487, Bsi2558

A továbbiakban a Bsi0144-es ellenanyagot tartalmazó alkeverék dot blot vizsgálatát szemléltetem. A 25. ábrán mutatom be az 57 frakció és a 3 antitestet tartalmazó keverék közti antigén-antitestreakció után előhívott dot blot membrán képét. Kerettel azt a 29 frakciót emeltem ki, melyek az 57 közül a legerősebb jeleket mutatták, és melyeket alkalmasnak találtam az egyedi ellenanyagokkal végzendő dot blot vizsgálatához.

Az 1. táblázat mutatja az 57 kiválasztott frakció elhelyezkedését a nitrocellulóz membránon. Pirossal kereteztem be a fent említett, egyedi antitestreakciókhoz kiválasztott 29 frakciót, és referenciakódjaikat is pirossal szedtem.

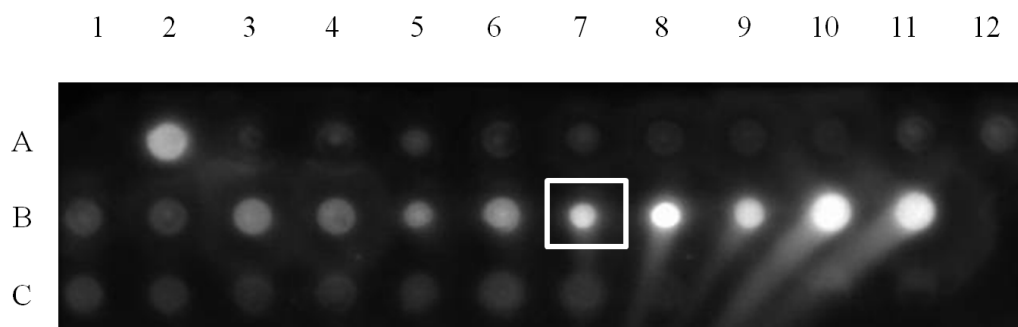


25. ábra: A Bsi0144, Bsi0180 és Bsi0601 monoklonális antitesteket tartalmazó alkeverék és az Analitkönyvtár átfogó szűrése után kiválasztott 57 végső frakció reakciójának dot blot membránképe. Kerettel kiemelve az egyedi ellenanyagok vizsgálatához kiválasztott frakciók láthatók. A1: negatív kontroll (blokkoló puffer), A2: pozitív kontroll (0,05 µg Bsi0144 monoklonális antitest). Mérési körülmények: fehérjemennyiség/minta: 3 µg, elsődleges ellenanyagok: Bsi0144, Bsi0180, Bsi0601 (1 µg/ml, 1 óra inkubálás), másodlagos ellenanyag: HRP-konjugált kecske anti-egér IgG (8000-szeres hígítás, 1 óra inkubálás). Előhívás: Pierce ECL Western Blotting Substrate kit, 30 másodperces expozíció.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	neg. kont.	poz. kont.	45%- G1- C25	45%- G1- C26	45%- G1- C27	45%- G1- C28	45%- G1- C29	45%- G1- C30	45%- G1- C31	45%- G1- C32	45%- G2- C16	45%- G2- C17
B	45%- G2- C18	45%- G2- C19	45%- G3- C24	45%- G3- C25	65%- G2- C20	65%- G2- C21	65%- G3- C26	65%- G3- C27	65%- G3- C28	75%- G3- C19	75%- G3- C20	45%- G2- C18
C	45%- G1- A25	45%- G1- A26	45%- G1- A27							45%- G1- A28	45%- G1- A29	45%- G1- A30
D	45%- G2- A27	45%- G2- A28	45%- G2- A29							45%- G3- A26	45%- G3- A27	45%- G3- A28
E												
F	65%- G1- A29	65%- G1- A30	65%- G2- A25	65%- G2- A26	65%- G2- A27	65%- G3- A24	65%- G3- A25				65%- G1- A29	65%- G1- A30
G	75%- G2- A17	75%- G2- A18	75%- G2- A19	75%- G3- A26	75%- G3- A27	75%- G3- A28	65%- G4- A18	65%- G4- A19			75%- G2- A17	75%- G2- A18
H	75%- G4- A29- H14	75%- G4- A28- H10	75%- G4- A28- H11	75%- G4- A29- H11	75%- G4- A29- H12	45%- G2- A22- H12	45%- G2- A22- H13	45%- G2- A23- H11	45%- G2- A23- H12	65%- G2- A20- H10	75%- G4- A29- H14	75%- G4- A28- H10

1. táblázat: Bsi0144, Bsi0180 és Bsi0601 ellenanyagokat tartalmazó alkeverék vizsgálata után kiválasztott 57 frakció elhelyezkedése a membránon. Piros kerettel kiemelve az egyedi ellenanyagok vizsgálatához kiválasztott frakciók láthatók, referenciakódjaik pirossal szedve.

A 29 kiválasztott frakciót ezután külön-külön reagáltattam az alkeverék mindhárom antitestjével. A 26. ábrán mutatom be a Bsi0144-es antitesttel végzett dot blot vizsgálat eredményét. A frakciók összetételét, koncentrációját és rendelkezésre álló mennyiségét figyelembe véve az immunprecipitációhoz és Western blothoz a kerettel kiemelt 65%-G3-C26 referenciakódú frakciót választottam ki. A frakció a keverék másik két antitestjével (Bsi0180, Bsi0601) nem adott ilyen erős jelet. A 2. táblázat a membrán térképét ábrázolja, a 65%-G3-C26 frakciót piros kerettel emeltem ki, referenciakódját pirossal szedtem.



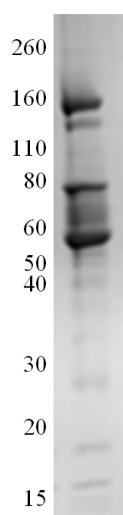
26. ábra: A Bsi0144, Bsi0180 és Bsi0601 monoklonális antitesteket tartalmazó alkeverékkel végzett vizsgálat után kiválasztott 29 frakció és a Bsi0144 ellenanyag reakciójának blotképe. Kerettel kiemelve az antigénazonosításhoz kiválasztott 65%-G3-C26 kódjelű frakció. A1: negatív kontroll (blokkoló puffer), A2: pozitív kontroll (0,05 µg Bsi0144 monoklonális antitest). Mérési körülmények: fehérjemennyiség/minta: 3 µg, elsődleges ellenanyagok: Bsi0144 (1 µg/ml, 1 óra inkubálás), másodlagos ellenanyag: HRP-konjugált kecske anti-egér IgG (8000-szeres hígítás, 1 óra inkubálás). Előhívás: Pierce ECL Western Blotting Substrate kit, 70 másodperces expozíció.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	neg. kont.	poz. kont.	45%- G1- C25	45%- G1- C26	45%- G1- C27	45%- G1- C28	45%- G1- C29	45%- G1- C30	45%- G1- C31	45%- G1- C32	45%- G2- C16	45%- G2- C17
B	45%- G2- C18	45%- G2- C19	45%- G3- C24	45%- G3- C25	65%- G2- C20	65%- G2- C21	65%- G3- C26	65%- G3- C27	65%- G3- C28	75%- G3- C19	75%- G3- C20	
C	65%- G1- A29	65%- G1- A30	65%- G2- A25	65%- G2- A26	65%- G2- A27	75%- G2- A17	75%- G2- A18	75%- G2- A19				

2. táblázat: A Bsi0144, Bsi0180 és Bsi0601 monoklonális antitesteket tartalmazó alkeverék vizsgálata után kiválasztott 29 frakció elhelyezkedése a membránon a Bsi0144 antitesttel végzett vizsgálat során. Piros kerettel kiemelve az antigénazonosításhoz kiválasztott 65%-G3-C26 frakció, referenciakódja pirossal szedve.

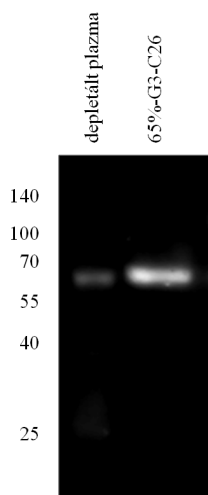
5.4.1.2. A Bsi0144-es antitest antigénje jelenlétének igazolása

A 27. ábra a 65%-G3-C26 kódjelű frakció SDS-PAGE elemzésének képét, a frakció fehérjeösszetételét mutatja. Kb. 55-60, 75-80 és 140-150 kDa mérettartományban erőteljes fehérjesávok figyelhetők meg, melyekről előzetesen feltételezni lehetett, hogy valamelyikük a 26. ábrán lévő membránképen (B7-es pozíció) látható erősségű jelet adhat a blotreakció eredményeképpen.



27. ábra: A 65%-G3-C26 referenciakódú Analitkönyvtár frakció elektroforetikus képe.

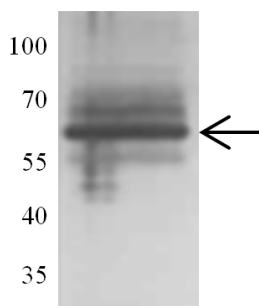
A Western blot elemzések alátámasztották azt a feltevést, mely szerint a Bsi0144-es antitest a frakcióban található valamelyik nagyobb mennyiségben lévő fehérjével reagált. Mind az affinitásalapú Human-7 Multiple Affinity Removal System kittel depletált plazma, mind pedig a 65%-G3-C26 frakció diszkrét jelet produkált a Bsi0144-es antitesttel kb. 55-60 kDa-os mérettartományban, ahogy azt a 28. ábra mutatja.



28. ábra: Human-7 Multiple Affinity Removal System-mel depletált plazma és a 65%-G3-C26 Analitkönyvtár-frakció Western blotreakciója a Bsi0144-es antitesttel. Kísérleti körülmények: 5 µg plazma, 5 µg fehérje a frakcióból, elsődleges antitest: Bsi0144 (5000-szeres hígítás, 3 óra inkubálás), másodlagos antitest: HRP-konjugált kecske anti-egér IgG (5000-szeres hígítás, 1 óra inkubálás). Előhívás: Pierce ECL Western Blotting Substrate kit, 1 perces expozíció.

5.4.1.3. A 65%-G3-C26 frakció immunprecipitációja

A 65%-G3-C26 frakció Bsi0144-es antitesttel, Dynabeads Protein G kittel végzett immunprecipitációja után a kb. 55-60 kDa molekulásúly-tartományban lévő fehérjesáv (nyíllal jelölve) dominánsan látható volt az eluátum SDS-poliakrilamid-gélelektroforetikus képén, amint azt a 29. ábra szemlélteti.



29. ábra: A 65%-G3-C26 frakció Bsi0144-es antitesttel végzett immunprecipitációjával kapott eluátum SDS-PAGE-képe. Nyíllal jelölve az eluátumban 55-60 kDa molekulásúly-tartományban dominánsan látható fehérjesáv.

5.4.1.4. A Bsi0144-es antitest antigénjének tömegspektrometriás meghatározása

A 65%-G3-C26 frakció Bsi0144-es antitesttel végzett immunprecipitációjának eluátumát és a 65%-G3-C26 frakciót oldatbani tripszines emésztés után *nanoflow*

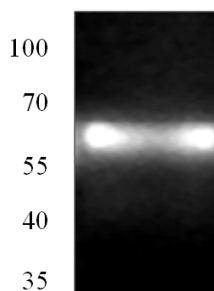
UHPLC-rendszerhez kapcsolt Q-TOF Premier tömegspektrométerrel az MTA Kémiai Kutatóintézetének Szerkezeti Kémiai Intézetében elemezték. Az MS-vizsgálat eredményének elemzése után a Bsi0144-es ellenanyaghoz tartozó antigént alfa-1-antikimotripszinként (α -1-ACT) azonosítottuk. A 30. ábrán szürke háttérrel emeltem ki a tömegspektrometriával meghatározott szekvenciárészeket az alfa-1-antikimotripszin szekvenciáján. A meghatározott szekvenciárészek az α -1-ACT teljes aminosavsorrendjének egyharmadát, 33,33%-át fedik le.

1	MERMLPLLAL	GLLAAGFCPA	VLCHPNSPLD	EENLTQENQD	RGTHVDLGLA
51	SANVDFAFSL	YKQLVLKAPD	KNVIFSPLSI	STALAFSLSG	AHNTTLTEIL
101	KGLKFNL TET	SEAEIHQS FQ	HLLRTL NQSS	DELQLSMGNA	MFVKEQLSLL
151	DRFTEDAKRL	YGSEAFATDF	QDSAAAKKLI	NDYVKN GTRG	KITDLIKDLD
201	SQTMMVLVNY	IFFKAKWEMP	FDPQDTHQSR	FYLSKKK WVM	VPMSLHHLT
251	IPYFRDEELS	CTVVELKYTG	NASALFILPD	QDKMEEVEAM	LLPETLKRWR
301	DSLEFREIGE	LYLPKFSISR	DYNLNDILLQ	LGIEEAFTSK	ADLSGITGAR
351	NLAVSQVVHK	AVLDVFEEGT	EASAATAVKI	TLLSALVETR	TIVRFNRPFL
401	MIIVPTDTQN	IFFMSKVTNP			

30. ábra: A alfa-1-antikimotripszin szekvenciája, melyen szürke háttérrel kiemelve láthatók a Bsi0144-es antitest tripszinnel emésztett antigénjének tömegspektrometriával meghatározott szekvenciárészei (33,33%-os lefedettség).

5.4.1.5. A Bsi0144-es ellenanyag antigénjének igazolása

A Bsi0144-es antitest antigénje azonosságának igazolására Western blot kísérlettel került sor, mely során a 65%-G3-C26 frakció Bsi0144-es antitesttel végzett immunprecipitációjával kapott eluátum és a Bsi0358, igazoltan alfa-1-antikimotripszinre specifikus monoklonális antitestet (BioSystems International Kft.) reagáltattuk egymással. A Western blot membrán előhívása után megfigyelhető diszkrét sáv az 55-60 kDa-os tartományban helyezkedett el, azonos mérettartományban, mint az immunprecipitáció eluátumában látható fehérje (29. ábra). Az eredmény bizonyítékul szolgált arra, hogy a Bsi0144-es antitesthez tartozó antigén az alfa-1-antikimotripszin. A membrán képe a 31. ábrán látható.



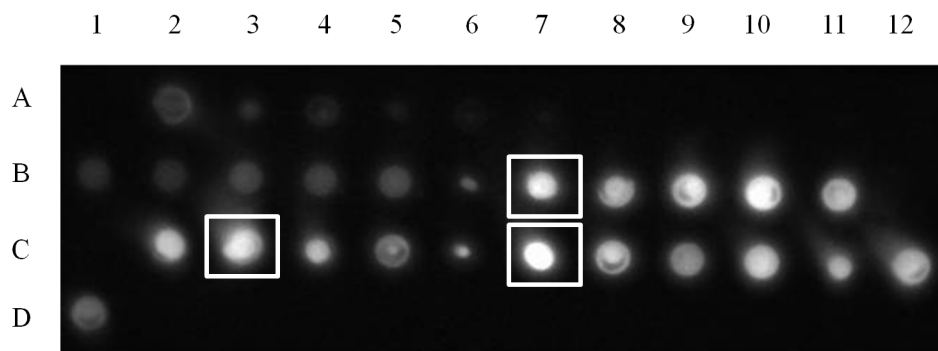
31. ábra: 65%-G3-C26 frakció Bsi0144-es antitesttel végzett immunprecipitációjával kapott eluátum Western blotreakciója a Bsi0358 alfa-1-antikimotripszinre specifikus monoklonális antitesttel. Kísérleti körülmények: 7 µl eluátum, elsődleges antitest: Bsi0358 (5000-szeres hígítás, éjszakán át tartó inkubálás), másodlagos antitest: HRP-konjugált kecske anti-egér IgG (5000-szeres hígítás, 1 óra inkubálás). Előhívás: Pierce ECL Western Blotting Substrate kit, 1 perces expozíció.

5.4.2. A Bsi0051-es antitesthez tartozó antigén azonosítása

5.4.2.1. A Bsi0051-es antitestet tartalmazó keverék vizsgálata

A Bsi0051-es számú monoklonális antitest egy olyan keverékben volt, melyben rajta kívül még 5 antitestet oldottam fel 1 µg/ml koncentrációban: Bsi0022, Bsi0032, Bsi0099, Bsi1245, Bsi1521. A 638 frakciót dot blottal reagáltattam az antitestkeverékkel, szekunder ellenanyag szintén 8000-szeresre hígított HRP-konjugált kecske-anti-egér IgG volt. A Pierce ECL Western Blotting Substrate kittel előhívott membránon a jeleket 0 és 5 között értékeltem. A vizsgálat következő lépéséhez, a keverék egyedi ellenanyagaival történő szűréshez 34 olyan frakciót választottam ki, melyek 3-nál nagyobb szignálintenzitást produkáltak. Az alábbiakban a Bsi0051-es ellenanyaghoz tartozó antigén azonosítási folyamatának lépéseit ismertetem. A munkában Patai Zoltán, a laboratóriumunkban diplomamunkáját társ-témavezetésemmel készítő MSc-hallgató is részt vett (Patai, 2012).

A 32. ábra mutatja a 34 kiválasztott frakció és a Bsi0051-es antitesttel végzett dot blot vizsgálat eredményét. Kerettel emeltem ki az összetétel, koncentráció és rendelkezésre álló mennyiség alapján további vizsgálatokra kiválasztott három frakciót, a B7-es pozícióban a 45%-G3-A21, a C3-as pozícióban a 65%-G4-A14, míg a C7-esben a 75%-G4-A19 referenciakódút. A 3. táblázat a membrán térképét ábrázolja. Piros kerettel emeltem ki a fent említett 45%-G3-A21, 65%-G4-A14 és 75%-G4-A19 frakciókat, referenciakódjaikat pirossal szedtem.



32. ábra: A Bsi0051-es számú antitestet tartalmazó keverékkel végzett dot blot szűrés után kiválasztott 34 végső Analitkönyvtár-frakció és a Bsi0051-es ellenanyag reakciójának blotképe. Kerettel kiemelve az immunprecipitációra kiválasztott frakciók láthatók. B7: 45%-G3-A21, C3: 65%-G4-A14, C7: 75%-G4-A19. A1: negatív kontroll (3 µl blokkoló puffer), A2: pozitív kontroll (0,05 µg Bsi0051-es monoklonális antitest). 3 µg fehérje/minta, elsődleges antitest: Bsi0051 (1 µg/ml, 1 óra inkubálás), másodlagos antitest: HRP-konjugált kecske anti-egér IgG (8000-szeres hígítás, 1 óra inkubálás). Előhívás: Pierce ECL Western Blotting Substrate kit, 18 másodperces expozíció.

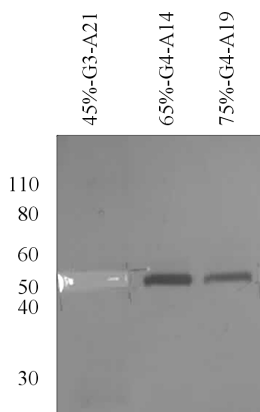
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	neg. kont.	poz. kont.	45%-G1-C27	45%-G1-C28	65%-G1-C22	65%-G1-C23	65%-G2-C18	65%-G3-C12	65%-G3-C13	65%-G3-C15	65%-G3-C20	65%-G3-C21
B	75%-G1-C14	75%-G1-C15	75%-G1-C22	75%-G1-C23	75%-G1-C24		45%-G3-A21	45%-G3-A22	65%-G3-A17	65%-G3-A18	65%-G3-A19	65%-G3-A35
C	65%-G3-A36	65%-G4-A13	65%-G4-A14	65%-G4-A15	75%-G3-A20	75%-G4-A18	75%-G4-A19	75%-G4-A20	65%-G3-A16-H11	65%-G2-A19-H11	65%-G3-A17-H9	65%-G3-A17-H10
D	45%-G3-A20											

3. táblázat: A Bsi 0051-es ellenanyagot tartalmazó keverék dot blot vizsgálata után kiválasztott 34 frakció elhelyezkedése a membránon a Bsi0051-es antitesttel végzett dot blot reakció során. Piros kerettel kiemelve az immunprecipitációra kiválasztott frakciók láthatók. B7: 45%-G3-A21, C3: 65%-G4-A14, C7: 75%-G4-A19. A frakciók referenciakódjait pirossal szedtem.

5.4.2.2. A kiválasztott frakciók immunprecipitációja

A 45%-G3-A21, a 65%-G4-A14 és 75%-G4-A19 referenciakódú frakciók Bsi0051-es antitesttel végzett immunprecipitációja után az eluátumok SDS-poliakrilamid-gélelektroforetikus képén mindhárom esetben diszkrét fehérjesávot lehetett megfigyelni

az 52-53 kDa-os molekulásúly magasságában. A 33. ábrán látható elektroferogram a tömegspektrometriás vizsgálatra kiválasztott 45%-G3-A21 referenciakódú frakcióból immunprecipitációval kapott fehérjesáv gélből kivágása után mutatja az elemzés eredményét.



33. ábra: A 45%-G3-A21, a 65%-G4-A14 és 75%-G4-A19 referenciakódú frakciók Bsi0051-es antitesttel végzett immunprecipitáció után kapott eluátumok SDS-PAGE-képe. A 45%-G3-A21 referenciakódú frakció fehérjesávja kivágva tömegspektrometriás azonosítás céljából.

5.4.2.3. A Bsi0051-es antitest antigénjének tömegspektrometriás meghatározása

A Bsi0051-es antitesthez tartozó antigént a gélből kivágott fragment tripszines emésztése után az MTA Szegedi Biológiai Központ Proteomikai Szolgáltató Laboratóriumában határozták meg tömegspektrometriával, Thermo LCQ Fleet háromdimenziós ioncsapdával kapcsolt Eldex nanoHPLC-rendszerrel. Az analízis eredményeképpen a fehérje magas, 44%-os szekvencialefedettséggel D vitaminkötő fehérjének bizonyult. A 34. ábrán a D vitaminkötő fehérje szekvenciája látható, melyen szürke háttérrel emeltem ki a tömegspektrometriával meghatározott szekvenciárészeket.

1	MKRVLVLLLA	VAFGHALERG	RDYEKNKVCK	EFSHLGKEDF	TSLSLVLYSR
51	KFPSGTFEQV	SQLVKEVVSL	TEACCAEGAD	PDCYDTRTSA	LSAKSCESNS
101	PFPVHPGTAE	CCTKEGLERK	LCMAALKHQP	QEFPTYVEPT	NDEICEAFRK
151	DPKEYANQFM	WEYSTNYGQA	PLSLLVSYTK	SYLSMVGSCC	TSASPTVCFL
201	KERLQLKHLS	LLTTLSNRVC	SQYAAYPEKK	SRLSNLIKLA	QKVPTADLED
251	VLPLAEDITN	ILSKCCESAS	EDCMAKELPE	HTVKLCDNLS	TKNSKFEDCC
301	QEKAMDVVF	CTYFMPAAQL	PELPDVELPT	NKDVCDPGNT	KVMDKYTFEL
351	SRRTHLPEVF	LSKVLEPTLK	SLGECCDVED	STTCFNAKGP	LLKKELSSFI
401	DKGQELCADY	SENTFTEYKK	KLAERLKAKL	PDATPTELAK	LVNKHDFAS
451	NCCSINSPPL	YCDSEIDAEL	KNIL		

34. ábra: A D vitaminkötő fehérje szekvenciája, melyen szürke háttérrel kiemelve láthatók a Bsi0051-es antitest tripszinnel emésztett antigénjének tömegspektrometriával meghatározott szekvenciárészei (44%-os lefedettség).

5.4.3. Az antigénazonosítási kísérletek összefoglalása

A vizsgálatok során dot blottal elemeztem még egy antitestkeveréket, mely a következő ellenanyagokat tartalmazta: Bsi0080, Bsi0086, Bsi0088, Bsi0136, Bsi0177. A 4. táblázat foglalja össze a sikeres antigénazonosítások eredményeit, feltüntetve azon frakciók referenciakódját, melyek erős pozitív jelet adtak a dot blot során, és amelyeket immunprecipitációs vizsgálatoknak vetettünk alá.

Antitest száma	Frakció	Meghatározott antigén (ID)
Bsi0051	45%-G3-A21	D vitaminkötő fehérje
Bsi0080	45%-G1-C17	alfa-1-antitripszin
Bsi0099	45%-G1-C27	cöruoplazmin
Bsi0115	45%-G2-A29	alfa-2-antiplazmin
Bsi0142	65%-G3-C27	alfa-1-antikimotripszin
Bsi0144	65%-G3-C26	alfa-1-antikimotripszin
Bsi0177	45%-G2-A10	cöruoplazmin
Bsi1521	65%-G3-A33	transztiretin

4. táblázat: Az antigénazonosítási vizsgálatok összefoglaló táblázata a 8 antitest számával és az Analitkönyvtár frakciók referenciakódjával, melyekből a fehérjéket immunprecipitációval sikerült szeparálni.

A táblázat adataiból látható, hogy az Analitkönyvtár frakcióit felhasználva, a többlépéses dot blot szűrés, Western blot, immunprecipitáció, tömegspektrometriás meghatározás munkafolyamatát követve 8 antitesthez tartozó antigént sikerült meghatározni.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. Az Analitkönyvtár létrehozása

Munkám első fázisában előállítottam egy 783 frakcióból álló Analitkönyvtárat, mely a humán plazmaproteom átfogó frakcionálásával készült. A Könyvtár készítése során különböző depletálási, kicsapási és kromatográfiás technikákat használtam. Többlépéses plazmafrakcionálást alkalmaztam, mivel ahogy a 2.2.3.3. pontban utaltam rá, a módszer alkalmazása elősegíti a plazmában alacsony és közepes koncentrációban lévő fehérjék dúsulását, ezáltal megkönnyítheti azonosításukat. A módszerek kiválasztásánál szempont volt, hogy az egyes szeparálási lépések a fehérjék több fizikai, kémiai tulajdonságán alapuljanak (oldékonyság, méret, töltés), ezáltal a nyert frakciók különböző karakterűek legyenek. Az elválasztási körülmények beállításánál arra törekedtem, hogy megőrizsem a plazmafehérjék natív állapotát a későbbi monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosítási vizsgálatokhoz.

Ahogy arra az Irodalmi áttekintés 2.2.3. pontjában kitértem, a proteomikai célú mintaelőkészítés során a két legnagyobb koncentrációban lévő plazmakomponens eltávolítása alapvető, hiszen a humán szérumalbumin és az immunglobulinok az alacsonyabb koncentrációban lévő, a biomarkerkutatások szempontjából jelentős fehérjék kimutatását jelentősen megnehezíthetik. Ennek megfelelően az Analitkönyvtár készítését e két plazmakomponens depletálásával kezdtem. Mivel 500 ml plazmából indultam ki, az antitest alapú módszerekkel szemben a Blue Sepharose-affinitáskromatográfia volt a legjobb megoldás az *albumin depletálására*, mind a nagy térfogatú minta feldolgozása, mind pedig a költségek mérséklése miatt. A módszer korábban részletezett jellemzőit (az állófázis nem kizárólag csak az albumint köti meg, nem 100%-os a HSA megkötése) is figyelembe véve a depletálás hatékonynak volt mondható. Az SDS-PAGE-analízisek a kb. 67 kDa molekulatömegű albumin mennyiségének szignifikáns csökkenését mutatták az átfolyó frakcióban. Az *immunglobulinok depletálására* tiofil interakciós kromatográfiát alkalmaztam, és a kapott frakciók SDS-poliakrilamid-gélelektroforetikus elemzése alapján ez a lépés is eredményesnek bizonyult. Az albumin- és immunglobulin-depletált átfolyó frakcióban az immunglobulinok mennyisége jelentős mértékben csökkent, míg az eluátumban az immunglobulinok dominanciája volt megfigyelhető.

A körülbelül 3,6 liter átfolyó frakció térfogatát ezután megfelelő *töményítő eljárással* csökkentenem kellett könnyebb kezelhetősége érdekében. A centrifugális koncentrátor-csővekkel végzett művelet eredményeképpen kapott 290 ml oldat már megfelelő térfogatú volt a további munkafolyamatok elvégzéséhez. A töményítés után *puffercserét* hajtottam végre, az immunglobulinok tiofil adszorbenshez kötődését segítő 0,5 M kálium-szulfátot dialízissel távolítottam el és cseréltem 7,4-es pH-jú PBS-re, hogy a plazmafehérjék a fiziológiához hasonló körülmények közé kerüljenek.

Az albumin- és immunglobulin-depletált plazma előfrakcionálását egy hagyományos plazmafrakcionálási technikával, *ammónium-szulfátos kisózással* végeztem, mely a fehérjéket eltérő oldékonyságuk alapján választja el. A plazmafehérjéket növekvő koncentrációjú ammónium-szulfáttal csaptam ki (35, 45, 65, 75%-os telítettség), aminek következtében 4 frakciót kaptam. A csapadékokat 7,4-es pH-jú PBS-ben oldottam vissza. Az SDS-PAGE képek tanúsága szerint az egymást követő frakciókban előfordultak átfedések, melyek adódhattak abból, hogy az egyes ammónium-szulfát-koncentrációk határán kicsapódó fehérjék mindkét frakcióba belekerülhettek. Az azonos molekulatömegnél detektált fehérjesávok mindemellett azonban nem feltétlenül jelenthettek azonos fehérjéket is, hiszen a frakcionálásnak ezen a szintjén az egyes, akár több ezer plazmafehérjét tartalmazó frakciók még nagyon komplexek voltak. A négy frakció közül a legkevesebb mennyiségű fehérjét a 35%-os precipitátum tartalmazta, mely összhangban van azzal, hogy az alacsony sókoncentrációnál a globulinok csapódnak ki (ld. 2.2.1.1. Kisózás), és az oldatból az előfrakcionálást megelőzően eltávolítottam a plazma második legnagyobb mennyiségben előforduló komponenseit, az immunglobulinokat, melyek depletálás nélkül, kisózás esetén az alacsonyabb telítettségű ammónium-szulfáttal kicsapott frakciókban lettek volna jelen. A visszaoldott csapadékokból az ammónium-szulfát eltávolítására nem dialízist alkalmaztam, hanem a következő frakcionálási lépésben végeztem el a sómentesítést.

A négy PBS-ben oldott precipitátum fehérjeit egy másik fizikai jellemző, a méret alapján frakcionáltam tovább *méretkizárásos kromatográfiával (géliszűréssel)*, amely egyúttal az ammónium-szulfátot is elválasztotta a fehérjéktől. Hosszú gélágy (60 cm) és alacsony áramlási sebesség (0,7 ml/perc) alkalmazásával a felbontást igyekeztem növelni. SDS-PAGE analízis alapján, a 14 méretkizárásos kromatográfiával nyert frakció még mindig nagyon komplexnek bizonyult.

Az ammónium-szulfátos kicsapás és méret szerinti frakcionálás után a fehérjék töltés szerinti elválasztása következett, előbb *kationcserés*, majd *anioncserés kromatográfiával*. A frakciók pH-ját oly módon állítottam be, hogy minden kationcserés lépés során keletkezzen az oszlopra nem kötődő fehérjéket tartalmazó átfolyó frakció, melyet az anioncserés kromatográfiához használhatok fel. Az anioncsere körülményeit pedig úgy határoztam meg, hogy lehetőleg a teljes fehérjemennyiség kötődjön az oszlopra, így az adott feloldott precipitátumban lévő minden fehérjét szeparálni tudjak. A választott 5,5-es (kationcsere) és 8,5-es pH (anioncsere) megfelelőnek bizonyult, mivel minden kationcserés elválasztás eredményezett fehérjetartalmú átfolyó frakciót, míg az anioncsere átfolyó frakciója nem tartalmazott detektálható mennyiségű fehérjét. Ahogy várható volt, az anioncserés lépés több elúciós kromatográfiás csúcsot és összetettebb frakciókat eredményezett, mint a kationcseres lépés. Köztudott, hogy a plazmában többségében savas karakterű fehérjék vannak jelen. Az általam beállított pH-értéken ezek karboxilcsoportjainak zöme deprotonálódott, így kötődni tudtak az immobilizált kvaterner ammóniumionokat tartalmazó oszlopra. Annak ellenére, hogy a gyűjtött frakciók komplexitása az SDS-PAGE elemzések alapján jelentősen csökkenő tendenciát mutatott, az elektroforetikus profilok az egyazon lépés során gyűjtött végső frakciók esetében is már mutattak jelentős eltéréseket. A kationcserés és anioncserés kromatográfiás elválasztás során gyűjtött frakciókat (összesen 638) már végső Analitkönyvtár frakcióknak tekintettem.

Méréseim alapján kiválasztottam a 20 legterményebb végső frakciót, melyeket egy következő elválasztási lépésnek, *hidrofób interakciós kromatográfiának* vettem alá. Az injektálandó fehérjék feloldásához használt ammónium-szulfát-oldat koncentrációját és pH-ját úgy szabtam meg, hogy egyrészt a só fehérjékre gyakorolt reverzibilis denaturáló hatása ne érvényesüljön, másrészt minden fehérje kötődjön az apoláris, fenil-szefaróz állófázisra. A kétféle ammónium-szulfát-koncentráció – 1 M a 45%-os, 2 M a 65 és 75%-os precipitátumok esetében – és a 7,1-es pH alkalmazása során sem kicsapódást nem láttam a frakciókban, sem az átfolyó frakciók nem tartalmaztak kimutatható mennyiségű fehérjét. Ahogy várható volt, a hidrofóbbabb (45%) frakciók esetében jobb felbontást kaptam, mint a kisebb mértékben hidrofóbbak (65 vagy 75%) elválasztásakor. Az SDS-PAGE elemzés a hidrofób interakciós kromatográfiával

szeparált frakciók (145 frakciót eredményezett ez a lépés) esetében számottevően eltérő elektroforetikus mintázatot mutatott (ld. 15. ábra).

A frakciószedés során nyert és akár egymást közvetlenül követő végső frakciók esetében tapasztalt azonosnak tűnő, Coomassie-festékkel festett fehérjesávokat tartalmazó SDS-PAGE képek sem okvetlenül utaltak azonos összetételű frakciókra. Érzékenyebb detektálási módszerek kimutathatnak kis mennyiségben lévő fehérjéket is, melyek előfordulhatnak akár kizárólag egy vagy csak néhány frakcióban. Összességében megállapítható volt, hogy a frakcionálás egymás után következő szintjeinél a frakciók komplexitása fokozatosan csökkent, így az Analitkönyvtárat további vizsgálatokhoz alkalmasnak tekinthettem.

6.2. A D vitaminkötő fehérje dúsulási útjának követése

Az Analitkönyvtár karakterizálásának és monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosítás céljára alkalmazhatóságának vizsgálatát először a D vitaminkötő fehérje dúsulási útjának az elválasztás különböző szintjein való követésével mutattam be. Az egyes frakcionálási szintekből – albumin- és immunglobulin-depletálás, kisózás, géliszűrés, kation- és anioncsere, hidrofób interakciós kromatográfia – származó, SDS-PAGE analízis alapján meghatározott összetétel és fehérjekoncentráció (>0,1 mg/ml) alapján kiválasztott 46 frakcióban a fehérje akkumulációját dot blot módszerrel elemeztem, és a szűréshez D vitaminkötő fehérje-specifikus monoklonális antitestet használtam. A Könyvtár kezdeti elválasztási lépései (ammónium-szulfátos kisózás és méretkizárásos kromatográfia) során gyűjtött frakciókban a D vitaminkötő fehérjét csak kis koncentrációban tudtam kimutatni. A végső frakciók között azonban találtam egy hidrofób interakciós kromatográfia során gyűjtött frakciót (65-G3-A17-H10), melyben a dúsulás számottevő volt, azaz az antigén 5-ös, maximális erősségű szignált eredményezett. A VDBP azonosságának igazolását Western blottal végeztem a pozitív frakcióban, ahol intenzív kemilumineszcens jelet detektáltam a megfelelő mérettartományban. A 65-G3-A17-H10 pozitív frakció és a szeparálási hierarchiában lévő, a könyvtárkészítés korábbi szintjeiből származó frakciók összehasonlító Western blot analízise szerint az egyre csökkenő komplexitású frakciókban a D vitaminkötő fehérje fokozatosan dúsult, azaz egyre nagyobb koncentrációban volt jelen. Ez az eredmény arra engedett következtetni, hogy az Analitkönyvtárban előfordulhat fehérjék

közel egyedi, esetleg csak kevés frakcióra kiterjedő akkumulációja, mely nagyobb specificitású, ezáltal várhatóan könnyebb fehérjeazonosítást tesz majd lehetővé, mint komplexebb biológiai minták, pl. a széles dinamikus koncentrációtartománnyal rendelkező plazma vizsgálata esetén.

6.3. Az Analitkönyvtár átfogó szűrése

Az Analitkönyvtár jellemzésének második szakasza magába foglalta a Könyvtár szűrését ismert antigénspecificitású monoklonális ellenanyagokkal, melyek fizikai és biokémiai tulajdonságai (hidrofilicitás/hidrofobicitás, méret, alak, asszociativitás, komplexképzés) pedig nagyrészt ismertek voltak. Azt vizsgáltam, hogy a kiválasztott fehérjék – melyek egyúttal betegségekre jellemző potenciális biomarkerek is – dúsulása az Analitkönyvtár frakcióiban összhangban van-e a fent említett sajátosságokkal.

A *fibrinogén* eloszlása megfelelt a vártaknak. A fehérje kicsapható az általam alkalmazottnál alacsonyabb koncentrációjú (22,5%) ammónium-szulfáttal is (Frisbie és mtsai, 1975), így a 35%-os ammónium-szulfát-precipitátumból eredeztethető frakciókban dúsult. Molekulatömege 340 kDa, jelenlétét emiatt a legnagyobb mérettartományban (G1) tudtam detektálni. A 35%-G1 kationcserével kapott frakciókon kívül más frakciókban nem lehetett kimutatni, így akkumulációja közel egyedinek volt mondható.

A *D vitaminkötő fehérje* közel egyedi (néhány frakcióban tapasztalható) dúsulást mutatott több, a molekulatömegének (52-59 kDa) megfelelő (G3, G4) frakcióban. Közismert aktinkötése (Huang és mtsai, 2010) miatt fordulhatott elő a komplex méretének megfelelő közepes (G2) mérettartományban. Egy nemrégiben tett felfedezés szerint kötődése lehetséges lipoproteinekkel – különösen a nagyon alacsony denzitásúakkal (VLDL, *very-low-density lipoprotein*) –, így akkumulálódhatott a legmagasabb molekulatömegű (G1) frakciókban is (Speeckaert és mtsai, 2010). A humán populációkban a D vitaminkötő fehérjének három elterjedt polimorfizmusa van, melyeket a *DBP* gén három kodomináns alléljének egyike kódolja. A három leggyakoribb allélen túl további 124 allélvariáns létezik, ezáltal a DBP az ismert legnagyobb mértékben polimorf lókus (White és Cooke, 2000). Az izoformák különböző fizikai és biokémiai tulajdonságokkal rendelkezhetnek, beleértve hidrofób/hidrofil karakterüket, oldékonyságukat, miáltal a kisózás körülményei

megváltozhatnak, mely magyarázata lehet akkumulációjára a különböző fizikai, kémiai és biokémiai karakterű Analitkönyvtár frakciókban (45, 65 és 75%-os ammónium-szulfát-precipitátumok szeparálásával kapott frakciókban) is megtalálható volt.

A *haptoglobin* nagymértékű szétterjedését az Analitkönyvtár végső frakcióiban magyarázhatja a fehérjére jellemző ismert genetikai polimorfizmus. Emberekben a haptoglobin három fenotípusa különböztethető meg, a legalacsonyabb molekulatömegű, 86 kDa-os Hp1-1, a Hp2-1 heteropolimer (86-300 kDa) és a Hp2-2 makromolekuláris komplex (170-900 kDa) (Delanghe és mtsai, 2011). A haptoglobin mindemellett nagy affinitással kötődik a hemoglobinhoz, gátolva annak oxidatív aktivitását (Wicher és Fries, 2006). A három izoforma különböző hidrofil/hidrofób karaktere magyarázhatja előfordulását mind a négy ammónium-szulfát-precipitátum elválasztásával kapott frakciókban, eltérő méretük pedig befolyásolta méretkizárásos kromatográfiás profiljukat. A komplexek a kötésben nem lévő fehérjéktől eltérő hidrofil/hidrofób karaktert is mutathatnak, melynek eredményeképpen a Könyvtár különböző tulajdonságokkal rendelkező végső frakcióiban is dúsulhatnak, amelyre az általam tapasztalt eloszlás is következtetni enged.

A *C9 komplement komponens-specifikus antitesttel* végzett elemzések rávilágítottak annak lehetőségére, hogy fehérjék a plazma leggyakoribb összetevőinek depletálására használt médiumokhoz és/vagy az albuminhoz kötődhetnek, így előfordulhat, hogy jelenlétük a Könyvtár végső frakcióiban már nem mutatható ki. A különböző nem-albumin-típusú plazmafehérjék affinitása a Blue Sepharose-hoz és ezáltal együttes depletálásuk az albuminnal ismert jelenség, melyet a 2.2.3.1. pontban tárgyaltam. A kezdeti depletálási lépések során gyűjtött, a könyvtárkészítés során fel nem dolgozott, -70 °C-on tárolt frakciók vizsgálata módot adhat további, a biomarkerkutatás szempontjából jelentős, de a végső frakciókban nem detektálható fehérjék azonosítására.

Az *alfa-2-makroglobulin-specifikus antitesttel* végrehajtott átfogó szűrés eredményeképpen az antigén eloszlása nagyrészt megfelelt a karaktere alapján valószínűsítettnek. Globuláris fehérje lévén várható volt, hogy alacsonyabb ammónium-szulfát-telítettségénél csapódik ki, és a jeleket túlnyomó többségében a 35 és 45%-os precipitátumok szeparálásával kapott frakciókban kaptam. Az antigén az egyik legnagyobb méretű plazma-glikoprotein, egy 720 kDa molekulatömegű homotetramer,

mely négy azonos, 180 kDa-os alegységből épül fel (Arnold és mtsai, 2006), így akkumulációja a nagyobb molekulatömegű fehérjét tartalmazó (méretkizárásos kromatográfia: G1) frakciókban szintén megfelelt a kísérlet előtt feltételezettnek. Előfordulása az alacsonyabb mérettartományú frakciókban lehet a könyvtárkészítés során előforduló proteolitikus hasítás eredménye, de nem zárható ki, hogy az irodalomban még nem ismert jelenséget takar.

A *hemopexin*ről ismert, hogy egy olyan 57 kDa molekulatömegű glikoprotein, mely a plazmafehérjék közül az egyik legerősebb kötést alakítja ki a hemmel (disszociációs állandó $<10^{-9}$ M) (Morello és mtsai, 2011), ekvimoláris sztöchiometriával (Aisen és mtsai, 1974). Egy molekula hem kötésével a komplex mérete nem változik jelentős mértékben, így valószínű, hogy a 45%-G3 (legalacsonyabb méretű) frakciókban tapasztalt szignálok az önálló hemopexin vagy hemopexin/hem-komplex jelenlétére utaltak. Bizonyos fehérjékben, pl. a mátrix-metalloproteinázokban (MMP-k) található egy szekvenciárészlet, a hemopexindomén, mely fehérjétől függően különböző mértékű homológiát mutathat a hemopexinnel (Piccard és mtsai, 2007). Nem kizárt annak a lehetősége, hogy a hemopexinspecifikus ellenanyag felismerte az MMP-kben található homológ domének epitópjait, ezáltal reagált a különböző méretű metalloproteinázokkal (ld. pozitív jelek a 45%-G1 és 45%-G2 frakciókban). Ugyanakkor nem vethető el az aggregáció eshetősége sem.

A *humán szérumalbumin* közismert tulajdonsága, hogy a plazmában fehérjéken (Lowenthal és mtsai, 2005) kívül számos, különböző típusú molekulához, pl. zsírsavakhoz, szteroid hormonokhoz, vitaminokhoz, aminosavakhoz vagy bizonyos metabolitokhoz kötődik (Curry, 2002). A HSA nagyfokú szétterülésének – a frakciók 28%-ában tapasztaltam pozitív jelet az albuminspecifikus antitesttel végzett dot blot vizsgálat után – egy lehetséges magyarázata, hogy a HSA a Könyvtár frakcióiban a fent említett molekulákhoz kötve volt jelen. A keletkezett komplexek mind méretükben, mind pedig fizikai, kémiai, biokémiai tulajdonságaikban különböztek az albumintól. A megváltozott jellegek következtében megváltozott affinitásuk a Blue Sepharose-hoz, így nem kötődtek az állófázishoz, aminek kapcsán a hagyományos módszer segítségével nem depletálódtak.

6.4. Az Analitkönyvtár felhasználása monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosításra

Az Analitkönyvtár karakterizálásának eredményeit értékelve a Könyvtárat alkalmasnak találtam monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosításra. Első lépésként egy többszakaszos átfogó dot blotszűrést alkalmaztam olyan antitestekkel, melyeknek antigénjei akkor még ismeretlenek voltak, majd a vizsgálatok után kiválasztottam az ellenanyagokkal erős intenzitású jelet adó frakciókat, melyekben az antigének azonosítását az immunprecipitáció –Western blot–tömegspektrometria munkafolyamat eredményezte. A bemutatott Bsi0051-es (D vitaminkötő fehérje) és Bsi0144-es antitesthez tartozó antigén (alfa-1-antikimotripszin) azonosítása két olyan reprezentatív kísérlet sor volt, mely bizonyította az antigénazonosítás során alkalmazott lépések megfelelő logikai sorrendjét és egymásra épülését. A Bsi0051-es antitest antigénjének esetében a nagyon magas, 44%-os szekvenciaazonosság meggyőző eredményt jelentett a fehérje azonosságát illetően. A Bsi0144-es ellenanyag meghatározása során az immunprecipitáció eluátumának alfa-1-antikimotripszin-specifikus antitesttel történő Western blot validálásán túl a detektált fehérje molekulatömege megfelelt az α -1-ACT-ének, mely érték a glikoziláció mértékétől függően 55 és 68 kDa között változhat (Zhang és Janciauskiene, 2002). A kísérletsorozatban a vizsgált ellenanyagok közül 8 antigént sikerült azonosítani.

6.5. A vizsgálatok tapasztalatainak összegzése

Kísérleteim eredményei azt mutatták, hogy a kidolgozott módszer megfelelt a kitűzött célnak, alkalmasnak bizonyult monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosításra. A *többlépéses plazmafrakcionálással (Analitkönyvtár-készítés)* elértem, hogy a plazmánál jóval kisebb komplexitású, kellően nagyszámú frakció álljon rendelkezésemre a további vizsgálatokhoz. A *Könyvtár átfogó dot blotszűrése* gyorsnak, egyszerűnek és nagy áteresztőképességűnek bizonyult. Kísérleteim során bebizonyítottam, hogy a plazmafehérjék fizikai, kémiai, biokémiai tulajdonságaiknak megfelelően oszlottak el az Analitkönyvtár frakcióiban, mely az elválasztás eredményességére adott további bizonyítékot, és egyben az antigénazonosítási folyamatra való alkalmasságát is meg lehetett állapítani belőle. A *monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosítás* folyamata sikeres volt abban a tekintetben is, hogy

a vizsgált antitestek közel felének esetében sikerült az antigént azonosítani, ami biztató a teljes munkafolyamat ilyen terű, jövőbeni felhasználhatóságára nézve a biomarker- és egyéb kutatások során.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az emberi vérplazma rendkívül széles koncentrációtartományban (12 nagyságrend) tartalmaz különböző biológiai funkciójú fehérjéket. Nagyfokú összetettsége folytán a közepes vagy kis mennyiségben megtalálható plazmafehérjék jellemzése és azonosítása nehéz, hosszadalmas, és nagy mintamennyiségeket igényel. A monoklonális antitest-proteomika egy olyan proteomikai eljárás, mely komplex biológiai minták ellen termeltetett nagyszámú olyan monoklonális antitestet alkalmaz profilírozásra, melyek antigénjei ismeretlenek. Az antigének azonosításának folyamata: biológiai minták reagáltatása ellenanyagokkal, immunprecipitáció, SDS-PAGE elemzés, Western blot validálás és tömegspektrometriás analízis.

Munkám célja egy olyan több száz frakciót tartalmazó Analitkönyvtár előállítása, jellemezése és monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosításra való alkalmazása volt, mely a plazmafehérjéket natív állapotban tartalmazza. Először 500 ml normál (egybe gyűjtött) humán plazmát albumin- és immunglobulin-mentesítettem, majd növekvő koncentrációjú ammónium-szulfátos kicsapással előfrakcionáltam. A precipitátumokat gélszűrőssel, kation- és anioncserével, továbbá hidrofób interakciós kromatográfiával frakcionáltam tovább. Az Analitkönyvtár jellemzése során dot blot és Western blot módszerrel követtem a D vitaminkötő fehérje szeparációs és dúsulási útját a frakcionálás különböző szintjein, majd ismert antigén specificitású monoklonális antitestekkel vizsgáltam 7 olyan fehérje eloszlását a Könyvtárban, melyeket a plazma kellően nagy mennyiségben tartalmaz ahhoz, hogy globális eloszlás vizsgálatára alkalmasak legyenek, emellett betegségekre jellemző markerek is. Az ismeretlen antigénspecificitású monoklonális antitestekhez tartozó antigének azonosítása a monoklonális antitest-proteomika munkamódszerével történt.

Munkám során előállítottam egy 783 frakcióból álló Analitkönyvtárat, mely a fehérjéket natív állapotban tartalmazta. Az egyes frakciókban lévő fehérjék száma a néhány 10-től akár néhány 100-ig is terjedhetett. A karakterizálás bizonyította, hogy a Könyvtár alkalmazható monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosításra. A monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosítás során 8 ellenanyaghoz tartozó antigént sikerült azonosítani.

A kapott eredmények alapján az Analitkönyvtár és a kidolgozott módszer alkalmasnak bizonyult monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosításra. A tapasztalatok biztatóak a teljes munkafolyamat jövőbeni felhasználhatóságára nézve a biomarker- és egyéb, fehérjeazonosítást célzó kutatások során.

8. SUMMARY

Human plasma contains a wide concentration range of proteins (12 orders of magnitude) with diverse biological functions. Due to its high complexity, the characterization and identification of medium or low abundant proteins often represent a difficult and time-consuming task and require a large amount of sample. Monoclonal antibody proteomics uses a large number of monoclonal antibodies of unknown antigen specificity raised against complex biological samples. The antigen identification process includes the reaction of biological samples with antibodies, immunoprecipitation, SDS-PAGE analysis, Western blot validation and mass spectrometric identification.

The aim of this work was to generate and characterize an Analyte Library that contained hundreds of fractions of native plasma proteins, and to use the Library for antigen identification in conjunction with mAb proteomics. First the albumin and immunoglobulins were depleted from 500 mL normal human plasma followed by pre-fractionation by ammonium sulphate precipitation steps. Each precipitate was then further fractionated by size exclusion chromatography, followed by cation and anion exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography. To demonstrate the characterization process of the Analyte Library, the separation route of vitamin D-binding protein was followed in all major fractionation levels by dot blot and Western blot. Comprehensive screening of the Library with seven mAbs of known abundant antigens of biomarker potential was also part of the study to reveal the distribution of these proteins. The identification of antigens corresponding to the mAb-s was conducted by the workflow of monoclonal antibody proteomics.

A 783-fraction containing Analyte Library comprising of native protein fractions was generated. The individual fractions contained some 10 or 100 proteins. As a result of the characterization, the Library was considered as applicable for monoclonal antibody proteomics-based antigen identification; and the antigens corresponding to eight mAbs have been successfully identified.

My studies demonstrated that the Analyte Library and the developed method was applicable for monoclonal antibody proteomics-based antigen identification, and suggests the potential of the developed workflow in biomarker and protein identification research.

9. ÚJ EREDMÉNYEK, MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS AZOK JELENTŐSÉGE

1. Munkám során a humán plazmaproteom többlépéses frakcionálásával 500 ml humán plazmából előállítottam egy átfogó, 783 frakcióból álló Analitkönyvtárat. A Könyvtár frakciói egymástól összetételükben az alkalmazott specifikus depletálási és a fehérjék különböző fizikai, kémiai, biokémiai sajátosságain alapuló kicsapási és kromatográfiás elválasztási módszereknek megfelelően – az egymáshoz közeli frakciók közti kisebb-nagyobb átfedések mellett – különböznek. Az elválasztási eljárások körülményeinek gondos megválasztásával a fehérjék natív állapotának megtartására törekedtem.
2. Az Analitkönyvtár karakterizálásával megállapítottam és bizonyítottam annak alkalmazhatóságát monoklonális antitest-proteomikai antigénazonosítás céljára. A D vitaminkötő fehérje dúsulási útját végig követtem a frakcionálás különböző szintjein, és azt találtam, hogy a frakcionálás előrehaladtával a frakciók komplexitása fokozatosan csökkent, és voltak olyan végső frakciók, melyekben a fehérje közel kizárólagosan dúsult. A Könyvtár átfogó, ismert plazmafehérjékre specifikus monoklonális antitestekkel való szűrésével nagyrészt az egyes antigének ismert fizikai, kémiai és biokémiai tulajdonságaik alapján várt vagy irodalmi adatok alapján megmagyarázható eloszlását mutattam ki.
3. Az Analitkönyvtár frakcióit eredményesen használtam fel monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosításra. A dot blot, Western blot, immunprecipitáció, tömegspektrometria munkafolyamatát alkalmazva 8 monoklonális ellenanyag esetében sikerült az antitesthez tartozó antigént azonosítani.

10. IRODALOMJEGYZÉK

10.1. Az értekezésben hivatkozott közlemények

Aisen P, Leibman A, Harris DC, Moss T (1974) Human hemopexin. Preparation and magnetic properties. *J. Biol. Chem.* 249: 6824–6827.

Anderson NL, Anderson NG (2002) The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics* 1: 845–867.

Arnold JN, Wallis R, Willis AC, Harvey DJ, Royle L, Dwek RA, Rudd PM, Sim RB (2006) Interaction of mannan binding lectin with alpha2 macroglobulin via exposed oligomannose glycans: a conserved feature of the thiol ester protein family? *J. Biol. Chem.* 281: 6955–6963.

Atkinson AJ, Jr., Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, Oates JA, Peck CC, Schooley RT, Spilker BA, Woodcock J, Zeger SL (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69: 89–95.

Bortner JD, Jr., Richie JP, Jr., Das A, Liao J, Umstead TM, Stanley A, Stanley BA, Belani CP, El-Bayoumy K (2011) Proteomic profiling of human plasma by iTRAQ reveals down-regulation of ITI-HC3 and VDBP by cigarette smoking. *J. Proteome Res.* 10: 1151–1159.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.

Burnouf T (1995) Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 664: 3–15.

Burnouf T (2007) Modern plasma fractionation. *Transfus. Med. Rev.* 21: 101–117.

Cheng E, Jinzenji D, Lorthiois APAA, de Carvalho RR, Tanaka-Azevedo AM, Raw I, Martins EAL (2010) Purification of coagulation factor VIII using chromatographic methods. Direct chromatography of plasma in anion exchange resins. *Biotechnol. Lett.* 32: 1207–1214.

Chiabrando D, Vinchi F, Fiorito V, Tolosano E (2011) Haptoglobin and hemopexin in heme detoxification and iron recycling. *Acute phase proteins – regulation and functions of acute phase proteins*, Veas F (szerk.), 12, 261–288. InTech, Rijeka.

Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL, Jr., Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, Taylor HL (1946) Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.* 68: 459–475.

Curry S (2002) Beyond expansion: structural studies on the transport roles of human serum albumin. *Vox Sang.* 83 Suppl 1: 315–319.

Csanky E, Olivova P, Rajnavolgyi E, Hempel W, Tardieu N, Elesne Toth K, Jullien A, Malderez-Bloes C, Kuras M, Duval MX, Nagy L, Scholtz B, Hancock W, Karger B, Guttman A, Takacs L (2007) Monoclonal antibody proteomics: discovery and prevalidation of chronic obstructive pulmonary disease biomarkers in a single step. *Electrophoresis* 28: 4401–4406.

Davalos D, Akassoglou K (2012) Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Semin. Immunopathol.* 34: 43–62.

Dayarathna MKDR, Hancock WS, Hincapie M (2008) A two step fractionation approach for plasma proteomics using immunodepletion of abundant proteins and multi-lectin affinity chromatography: Application to the analysis of obesity, diabetes, and hypertension diseases. *J. Sep. Sci.* 31: 1156–1166.

De Bock M, de Seny D, Meuwis M-A, Servais A-C, Minh TQ, Closset J, Chapelle J-P, Louis E, Malaise M, Merville M-P, Fillet M (2010) Comparison of three methods for fractionation and enrichment of low molecular weight proteins for SELDI-TOF-MS differential analysis. *Talanta* 82: 245–254.

de Mattos AA (2011) Current indications for the use of albumin in the treatment of cirrhosis. *Ann. Hepatol.* 10 Suppl 1: S15–20.

de Sain-van der Velden MGM, Rabelink TJ, Reijngoud D-J, Gadellaa MM, Voorbij HAM, Stellaard F, Kaysen GA (1998) Plasma alpha 2 macroglobulin is increased in nephrotic patients as a result of increased synthesis alone. *Kidney Int.* 54: 530–535.

de Villiers V, Wilson JGS (1978) Ethanol and heath-treated plasma fractionation methods in South Africa. *Vox Sang.* 35: 405–411.

Delahunty CM, Yates JR III (2007) MudPIT: multidimensional protein identification technology. *Biotechniques* 43: 563, 565, 567.

Delanghe JR, Langlois MR, De Buyzere ML (2011) Haptoglobin polymorphism: a key factor in the proatherogenic role of B cells? *Atherosclerosis* 217: 80–82.

Denizli A (2011) Plasma fractionation: conventional and chromatographic methods for albumin purification. *Hacettepe J. Biol. Chem.* 39: 315–341.

Disanto G, Ramagopalan SV, Para AE, Handunnetthi L (2011) The emerging role of vitamin D binding protein in multiple sclerosis. *J. Neurol.* 258: 353–358.

Ernst-Cabrera K, Wilchek M (1988) High-performance affinity-chromatography. *Trends Anal. Chem.* 7: 58–63.

Federici AB (2003) The factor VIII/von Willebrand factor complex: basic and clinical issues. *Haematologica* 88: EREP02.

Frisbie JH, O'Connell DJ, Tow DE, Sasahara AA, Belko JS (1975) Autologous radioiodinated fibrinogen, simplified. *J. Nucl. Med.* 16: 393–401.

GE Healthcare (2007) Affinity Chromatography: Principles and Methods, 70–73. GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala.

Gianazza E, Arnaud P (1982) A general method for fractionation of plasma proteins. Dye-ligand affinity chromatography on immobilized Cibacron blue F3-GA. *Biochem. J.* 201: 129–136.

Guergova-Kuras M, Kurucz I, Hempel W, Tardieu N, Kádas J, Malderez-Bloes C, Jullien A, Kieffer Y, Hincapie M, Guttman A, Csánky E, Dezső B, Karger BL, Takács L (2011) Discovery of lung cancer biomarkers by profiling the plasma proteome with monoclonal antibody libraries. *Mol. Cell. Proteomics* 10: M111 010298.

Guo Q, Zhang B, Dong X, Xie Q, Guo E, Huang H, Wu Y (2009) Elevated levels of plasma fibrinogen in patients with pancreatic cancer: possible role of a distant metastasis predictor. *Pancreas* 38: e75–79.

Habeeb AFSA, Francis RD (1976) Preparation of human immunoglobulin by ammonium sulfate precipitation. *Vox Sang.* 31: 423–434.

Hageman JH, Kuehn GD (1992) Boronic Acid matrices for the affinity purification of glycoproteins and enzymes. *Methods Mol. Biol.* 11: 45–71.

Hernández J, Thompson IM (2004) Prostate-specific antigen: a review of the validation of the most commonly used cancer biomarker. *Cancer* 101: 894–904.

Ho A-S, Cheng C-C, Lee S-C, Liu M-L, Lee J-Y, Wang W-M, Wang C-C (2010) Novel biomarkers predict liver fibrosis in hepatitis C patients: alpha 2 macroglobulin, vitamin D binding protein and apolipoprotein AI. *J. Biomed. Sci.* 17: 58.

Howe PE (1921) The use of sodium sulfate as the globulin precipitant in the determination of proteins in blood. *J. Biol. Chem.* 49: 93–107.

Huang T-J, Weng Y-J, Li Y-Y, Cheng C-C, Hsu RW-W (2010) Actin-free Gc-globulin after minimal access and conventional anterior lumbar surgery. *J. Surg. Res.* 164: 105–109.

Hutchens TW, Porath J (1986) Thiophilic adsorption of immunoglobulins – analysis of conditions optimal for selective immobilization and purification. *Anal. Biochem.* 159: 217–226.

- Ikari Y, Mulvihill E, Schwartz SM (2001) alpha 1-proteinase inhibitor, alpha 1-antichymotrypsin, and alpha 2-macroglobulin are the antiapoptotic factors of vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 276: 11798–11803.
- Jin W-H, Dai J, Li S-J, Xia Q-C, Zou H-F, Zeng R (2005) Human plasma proteome analysis by multidimensional chromatography prefractionation and linear ion trap mass spectrometry identification. *J. Proteome Res.* 4: 613–619.
- Josic Dj, Schwinn H, Stadler M, Strancar A (1994) Purification of factor VIII and von Willebrand factor from human plasma by anion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 662: 181–190.
- Kang S-M, Sung H-J, Ahn J-M, Park J-Y, Lee S-Y, Park C-S, Cho J-Y (2011) The Haptoglobin beta chain as a supportive biomarker for human lung cancers. *Mol. Biosyst.* 7: 1167–1175.
- Kekwick RA, Mackay ME, Nance MH, Record BR (1955) The purification of human fibrinogen. *Biochem. J.* 60: 671–683.
- Kibrick AC, Blonstein M (1948) Fractionation of serum into albumin and alpha-, beta-, and gamma-globulin by sodium sulfate. *J. Biol. Chem.* 176: 983–987.
- Kistler P, Nitschmann H (1962) Large scale production of human plasma fractions. Eight years experience with the alcohol fractionation procedure of Nitschmann, Kistler and Lergier. *Vox Sang.* 7: 414–424.
- Knight E Jr, Fahey D (1981) Human fibroblast interferon. An improved purification. *J. Biol. Chem.* 256: 3609–3611.
- Kobata A, Endo T (1992) Immobilized lectin columns: useful tools for the fractionation and structural analysis of oligosaccharides. *J. Chromatogr.* 597: 111–122.
- Körmöczi GF, Säemann MD, Buchta C, Peck-Radosavljevic M, Mayr WR, Schwartz DWM, Dunkler D, Spitzauer S, Panzer S (2006) Influence of clinical factors on the haemolysis marker haptoglobin. *Eur. J. Clin. Invest.* 36: 202–209.
- Kullolli M, Hancock WS, Hincapie M (2010) Automated platform for fractionation of human plasma glycoproteome in clinical proteomics. *Anal. Chem.* 82: 115–120.
- Kumpalume P, Podmore A, LePage C, Dalton J (2007) New process for the manufacture of alpha-1 antitrypsin. *J. Chromatogr. A* 1148: 31–37.
- Kunz W, Henle J, Ninham BW (2004) 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 9: 19–37.

- Levreri I, Musante L, Petretto A, Bruschi M, Candiano G, Melioli G (2005) Separation of human serum proteins using the Beckman-Coulter PF2D system: analysis of ion exchange-based first dimension chromatography. *Clin. Chem. Lab. Med.* 43: 1327–1333.
- Lewis SJ, Stephens E, Florou G, Macartney NJ, Hathaway LS, Knipping J, Collins PW (2007) Measurement of global haemostasis in severe haemophilia A following factor VIII infusion. *Br. J. Haematol.* 138: 775–782.
- Liu X, Valentine SJ, Plasencia MD, Trimpin S, Naylor S, Clemmer DE (2007) Mapping the human plasma proteome by SCX-LC-IMS-MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18: 1249–1264.
- Lowenthal MS, Mehta AI, Frogale K, Bandle RW, Araujo RP, Hood BL, Veenstra TD, Conrads TP, Goldsmith P, Fishman D, Petricoin EFI, Liotta LA (2005) Analysis of albumin-associated peptides and proteins from ovarian cancer patients. *Clin. Chem.* 51: 1933–1945.
- Mahn A, Ismail M (2011) Depletion of highly abundant proteins in blood plasma by ammonium sulfate precipitation for 2D-PAGE analysis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879: 3645–3648.
- Mahn A, Reyes A, Zamorano M, Cifuentes W, Ismail M (2010) Depletion of highly abundant proteins in blood plasma by hydrophobic interaction chromatography for proteomic analysis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 878: 1038–1044.
- Martini WZ (2009) Fibrinogen metabolic responses to trauma. *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.* 17: 2.
- Matejtschuk P, Dash CH, Gascoigne EW (2000) Production of human albumin solution: a continually developing colloid. *Br. J. Anaesth.* 85: 887–895.
- Medvedev A, Kopylov A, Buneeva O, Zgoda V, Archakov A (2012) Affinity-based proteomic profiling: problems and achievements. *Proteomics* 12: 621–637.
- Miyoshi E, Shinzaki S, Moriwaki K, Matsumoto H (2010) Identification of fucosylated haptoglobin as a novel tumor marker for pancreatic cancer and its possible application for a clinical diagnostic test. *Methods Enzymol.* 478: 153–164.
- Monzo A, Bonn GK, Guttman A (2007) Boronic acid-lectin affinity chromatography. 1. Simultaneous glycoprotein binding with selective or combined elution. *Anal. Bioanal. Chem.* 389: 2097–2102.
- Monzo A, Olajos M, De Benedictis L, Rivera Z, Bonn GK, Guttman A (2008) Boronic acid lectin affinity chromatography (BLAC). 2. Affinity micropartitioning-mediated comparative glycosylation profiling. *Anal. Bioanal. Chem.* 392: 195–201.

Morello N, Bianchi FT, Marmiroli P, Tonoli E, Rodriguez Menendez V, Silengo L, Cavaletti G, Vercelli A, Altruda F, Tolosano E (2011) A role for hemopexin in oligodendrocyte differentiation and myelin formation. *PLoS One* 6: e20173..

Murakoshi Y, Honda K, Sasazuki S, Ono M, Negishi A, Matsubara J, Sakuma T, Kuwabara H, Nakamori S, Sata N, Nagai H, Ioka T, Okusaka T, Kosuge T, Shimahara M, Yasunami Y, Ino Y, Tsuchida A, Aoki T, Tsugane S, Yamada T (2011) Plasma biomarker discovery and validation for colorectal cancer by quantitative shotgun mass spectrometry and protein microarray. *Cancer Sci.* 102: 630–638.

Nilsson T, Mann M, Aebersold R, Yates JR III, Bairoch A, Bergeron JJM (2010) Mass spectrometry in high-throughput proteomics: ready for the big time. *Nat. Methods* 7: 681–685.

Obialo CI, Okonofua EC, Nzerue MC, Tayade AS, Riley LJ (1999) Role of hypoalbuminemia and hypocholesterolemia as copredictors of mortality in acute renal failure. *Kidney Int.* 56: 1058–1063.

Patai Z (2012) A humán plazma proteomot reprezentáló Analitkönyvtár karakterizálása. OEC Molekuláris Medicina Kutatóközpont, Debreceni Egyetem, Debrecen.

Piccard H, Van den Steen PE, Opdenakker G (2007) Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins. *J. Leukoc. Biol.* 81: 870–892.

Porath J, Maisano F, Belew M (1985) Thiophilic adsorption – a new method for protein fractionation. *FEBS Lett.* 185: 306–310.

Selvaraju S, El Rassi Z (2012) Liquid-phase-based separation systems for depletion, prefractionation and enrichment of proteins in biological fluids and matrices for in-depth proteomics analysis – an update covering the period 2008-2011. *Electrophoresis* 33: 74–88.

Shah A, Singh H, Sachdev V, Lee J, Yotsukura S, Salgia R, Bharti A (2010) Differential serum level of specific haptoglobin isoforms in small cell lung cancer. *Curr. Proteomics* 7: 49–65.

Speeckaert M, Huang G, Delanghe JR, Taes YEC (2006) Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clin. Chim. Acta* 372: 33–42.

Speeckaert MM, Taes YE, De Buyzere ML, Christophe AB, Kaufman J-M, Delanghe JR (2010) Investigation of the potential association of vitamin D binding protein with lipoproteins. *Ann. Clin. Biochem.* 47: 143–150.

Subramanian S (1984) Dye-ligand affinity chromatography: the interaction of Cibacron Blue F3GA with proteins and enzymes. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 16: 169–205.

- Tanaka K, Sawatani E, Shigueoka EM, Campos TCXB, Nakao HC, Dias GA, Fujita RK, Arashiro F (1998) A chromatographic method for the production of a human immunoglobulin G solution for intravenous use. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31: 1375–1381.
- Tang J, Gao M, Deng C, Zhang X (2008) Recent development of multi-dimensional chromatography strategies in proteome research. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 866: 123–132.
- Taylor GA, Mazhindu HN, Findlay JBC, Peacock M (1986) Purification of vitamin D binding protein from human plasma using high performance liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta* 155: 31–41.
- te Booy MPWM, Faber A, de Jonge E, Wolterink EP, Riethorst W, Beugeling T, Bantjes A, Over J, König BW (1990) Large-scale purification of factor VIII by affinity chromatography: optimization of process parameters. *J. Chromatogr.* 503: 103–114.
- Travis J, Bowen J, Tewksbury D, Johnson D, Pannell R (1976) Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin-depleted plasma. *Biochem. J.* 157: 301–306.
- Turiák L, Ozohanics O, Marino F, Drahos L, Vékey K (2011) Digestion protocol for small protein amounts for nano-HPLC-MS(MS) analysis. *J. Proteomics* 74: 942–947.
- Vasileva R, Jakab M, Haskó F (1981) Application of ion-exchange chromatography for the production of human albumin. *J. Chromatogr.* 216: 279–284.
- Walsh GM, Rogalski JC, Klockenbusch C, Kast J (2010) Mass spectrometry-based proteomics in biomedical research: emerging technologies and future strategies. *Expert Rev. Mol. Med.* 12: e30.
- Wang D, Hincapie M, Guergova-Kuras M, Kadas J, Takacs L, Karger BL (2010) Antigen identification and characterization of lung cancer specific monoclonal antibodies produced by mAb proteomics. *J. Proteome Res.* 9: 1834–1842.
- Wang H, Clouthier SG, Galchev V, Misek DE, Duffner U, Min C-K, Zhao R, Tra J, Omenn GS, Ferrara JLM, Hanash SM (2005) Intact-protein-based high-resolution three-dimensional quantitative analysis system for proteome profiling of biological fluids. *Mol. Cell. Proteomics* 4: 618–625.
- Wang L, Zhong N (2012) Application of the ProteomeLab (TM) PF2D protein fractionation system in proteomic analysis for human genetic diseases. *Cent. Eur. J. Chem.* 10: 836–843.
- White P, Cooke N (2000) The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends Endocrinol. Metab.* 11: 320–327.

Wicher KB, Fries E (2006) Haptoglobin, a hemoglobin-binding plasma protein, is present in bony fish and mammals but not in frog and chicken. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 4168–4173.

Wu C, Tran JC, Zamdborg L, Durbin KR, Li M, Ahlf DR, Early BP, Thomas PM, Sweedler JV, Kelleher NL (2012) A protease for 'middle-down' proteomics. *Nat. Methods* 9: 822–824.

Wu S-L, Kim J, Hancock WS, Karger B (2005) Extended Range Proteomic Analysis (ERPA): a new and sensitive LC-MS platform for high sequence coverage of complex proteins with extensive post-translational modifications-comprehensive analysis of beta-casein and epidermal growth factor receptor (EGFR). *J. Proteome Res.* 4: 1155–1170.

Zhang S, Janciauskiene S (2002) Multi-functional capability of proteins: alpha1-antichymotrypsin and the correlation with Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 4: 115–122.

Zolotarjova N, Mrozinski P, Chen H, Martosella J (2008) Combination of affinity depletion of abundant proteins and reversed-phase fractionation in proteomic analysis of human plasma/serum. *J. Chromatogr. A* 1189: 332–338.

10.2. Publikációs lista



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/312/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Kovács András László

Neptun kód: XQQ9C4

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

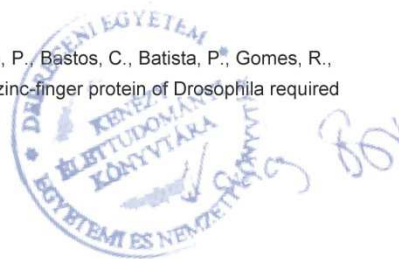
A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kovács, A.**, Patai, Z., Guttman, A., Kádas, J., Takács, L., Kurucz, I.: Fractionation of the human plasma proteome for monoclonal antibody proteomics-based biomarker discovery 2: Antigen identification by dot blot array screening.
Electrophoresis. "accepted by publisher", 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201200677>
IF:3.261 (2012)
2. **Kovács, A.**, Guttman, A.: Medicinal chemistry meets proteomics: Fractionation of the human plasma proteome.
Curr. Med. Chem. 20 (4), 483-490, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/0929867311320040001>
IF:4.07 (2012)
3. **Kovács, A.**, Sperling, E., Lázár, J., Balogh, A., Kádas, J., Szekrényes, Á., Takács, L., Kurucz, I., Guttman, A.: Fractionation of the human plasma proteome for monoclonal antibody proteomics-based biomarker discovery.
Electrophoresis. 32 (15), 1916-1925, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201100018>
IF:3.303



További Közlemények

4. Bódi, Z., Pepó, P., **Kovács, A.**: Morphology of tassel components and their relationship to some quantitative features in maize.
Cereal Res. Commun. 36 (2), 353-360, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/CRC.36.2008.2.15>
5. Bódi, Z., Pepó, P., **Kovács, A.**: Investigation on direct and reciprocal crosses in maize (*Zea mays* L.).
Acta Agron. Hung. 56 (2), 179-185, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AAgr.56.2008.2.7>
6. Bódi, Z., Pepó, P., **Kovács, A.**, Széles, É., Györi, Z.: Macro- and microelement contents of blue and red kernel corns.
Cereal Res. Commun. 36 (1), 147-155, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/CRC.36.2008.1.15>
7. Pepó, P., **Kovács, A.**: Histological aspects of the cryopreservation of potato.
Acta Agron. Hung. 56 (3), 341-348, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AAgr.56.2008.3.10>
8. Pepó, P., **Kovács, A.**, Tóth, S., Bódi, Z.: Investigation of maize hybrids based on direct and reciprocal crosses.
Cereal Res. Commun. 35 (2/2), 913-916, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/CRC.35.2007.2.187>
IF:1.19
9. Mádi, A., Kárpáti, L., **Kovács, A.**, Muszbek, L., Fésüs, L.: High-throughput scintillation proximity assay for transglutaminase activity measurement.
Anal. Biochem. 343 (2), 256-262, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2005.05.034>
IF:2.67
10. Page, A.R., **Kovács, A.**, Deák, P., Török, T., Kiss, I., Dario, P., Bastos, C., Batista, P., Gomes, R., Ohkura, H., Russell, S., Glover, D.M.: Spotted-dick, a zinc-finger protein of *Drosophila* required for expression of Orc4 and S phase.
EMBO J. 24 (24), 4304-4315, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600890>
IF:10.053



Összesített impakt faktor: 24.547

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 10.634

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.09.26



11. TÁRGYSZAVAK

11.1. Tárgyszavak

Analitkönyvtár

biomarker

dot blot

fehérjeazonosítás

frakcionálás

immunprecipitáció

kromatográfia

monoklonális antitest-proteomika

plazma

tömegspektrometria

Western blot

11.2. Keywords

Analyte Library

biomarker

chromatography

dot blot

fractionation

immunoprecipitation

mass spectrometry

monoclonal antibody proteomics

plasma

protein identification

Western blot

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Guttman András tudományos tanácsadónak, a Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratórium igazgatójának munkám során nyújtott szakmai iránymutatásáért és támogatásáért.

Köszönöm Dr. Kurucz István és Dr. Takács László számos elméleti és gyakorlati útmutatását, segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Sperling Editnek, Dr. Kádas Jánosnak és Dr. Lázár Józsefnek elméleti és gyakorlati tanácsaikért.

Köszönöm Szekrényes Ákos, Patai Zoltán, Balogh Attila és Elek Dóra közreműködését a kísérletek kivitelezésében.

Köszönetemet fejezem ki a Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratórium és a BioSystems International Kft. munkatársainak, akik segítették munkámat.

Köszönöm Dr. Szabó Szilárdnak az értekezés alapos átnézését és hasznos megjegyzéseit, kiegészítéseit.

A doktori képzési programot a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 sz. projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.



SZÉCHENYI TERV

Értekezésemet édesanyám, Dr. Kovácsné Dr. Hadady Katalin (1946–1998) emlékének ajánlom.

13. FÜGGELÉK

13.1. Egyéb közlemények

13.1.1. Magyar nyelvű folyóiratcikkek

Bódi Z, Pepó P, **Kovács A** (2007) A hektolitertömeg értékének változása eltérő genotípusok esetén kukoricánál (*Zea mays* L.). *Acta Agronomica Óváriensis* 49: 569–573.

Bódi Z, Pepó P, **Kovács A** (2007) Kék és vörös szemszínű kukoricák nemesítési értékelése. *Agrártudományi Közlemények/Acta Agraria Debreceniensis* 26: 239–243.

Bódi Z, Pepó P, **Kovács A** (2007) Keresztezési irányok vizsgálata kukoricánál. *Agrártudományi Közlemények/Acta Agraria Debreceniensis* 27: 43–48.

13.1.2. Előadások az értekezés témaköréből

Kovács A: Generation and characterization of a comprehensive analyte library representing the human plasma proteome. *PhD Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, University of Debrecen*, Debrecen, 2010. június 1.

Kovács A: Fractionation of the human plasma proteome for monoclonal antibody proteomics based biomarker discovery. *Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, University of Debrecen*, Debrecen, 2011. június 6.

13.1.3. Előadások az értekezés témakörén kívül

Kovács A: Ismert transzglutaminázokkal homológ fehérjék vizsgálata különböző rovarfajokban. *Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Általános Orvostudományi Kar Ph.D. és TDK Tudományos Diáktalálkozója*, Debrecen, 2000. április 4.

Kovács A: Ismert transzglutaminázokkal homológ cDNS-szakasz vizsgálata ecetmuslicában. *Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Általános Orvostudományi Kar Ph.D. és TDK Tudományos Diáktalálkozója*, Debrecen, 2001. február 19.

Mádi A, Kárpáti L, **Kovács A**, Muszbek L, Fésüs L: High-throughput scintillation proximity assay for transglutaminase activity measurement. *8th International Conference on Protein Crosslinking and Transglutaminases (PCL8)*, Lübeck, Németország, 2005. szeptember 2.

Pepó P, Bódi Z, **Kovács A:** A ciklotron alkalmazásai a növénygenetikában és nemesítésben. *Fizikai kutatási eredmények alkalmazása, előadóiülés*, Debrecen, 2006. november 15.

13.1.4. Poszterek az értekezés témaköréből

Kovács A, Sperling E, Takács L, Kurucz I, Kádas J, Guttman A: Generation and characterization of a comprehensive analyte library representing the human plasma proteome. *25th International Symposium on Microscale Bioseparations (MSB 2010)*, Prága, Csehország, 2010. március 21–25.

Kovács A, Sperling E, Lázár J, Balogh A, Kádas J, Szekrényes Á, Takács L, Kurucz I, Guttman A: Humán plazma frakcionálása monoklonális ellenanyag-proteomikai alapú biomarker-felfedezéshez. *Magyar Kémikusok Egyesülete 1. Nemzeti Konferencia*, Sopron, 2011. május 22–25.

Kovács A, Sperling E, Mittermayr S, Lázár J, Balogh A, Kádas J, Szekrényes Á, Takács L, Kurucz I: Fractionation of the human plasma proteome for monoclonal antibody proteomics based biomarker discovery. *36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2011)*, Budapest, 2011. június 19–23.

Kovács A, Patai Z, Sperling E, Lázár J, Balogh A, Kádas J, Szekrényes Á, Takács L, Kurucz I, Guttman A: Biomarker screening of the human plasma proteome with disease specific monoclonal antibodies. *8th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis (CECE 2011)*, Brno, Csehország, 2011. november 3–4.

Kovács A, Patai Z, Kádas J, Takács L, Kurucz I, Guttman A: Monoclonal antibody proteomics: Antigen identification by mini dot-blot array screening. *27th International Symposium on MicroScale Bioseparations and Analyses (MSB2012)*, Genf, Svájc, 2012. február 12–15.

Patai Z, **Kovács A**, Kurucz I, Takács L, Guttman A: Monoclonal antibody proteomics based characterization of a human plasma proteome library. *38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2012)*, Anaheim, Egyesült Államok, 2012. június 16–21.

13.1.5. Poszterek az értekezés témakörén kívül

Kovács A, Blaskó B, Mádi A, Fésüs L: Ismert transzglutaminázok génjeivel homológ cDNS-klón vizsgálata ecetmuslicában. *A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 6. Munkaértekezlete*, Sárospatak, 2001. május 14–17.

Blaskó B, Mádi A, **Kovács A**, Fésüs L: Protein diszulfid izomeráz jellemzése *Caenorhabditis elegans*-ban. *A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 6. Munkaértekezlete*, Sárospatak, 2001. május 14–17.

Blaskó B, **Kovács A**, Mádi A, Fésüs L: Protein diszulfid izomeráz jellemzése *Caenorhabditis elegans*-ban. *X. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok*, Siófok, 2002. március 27–29.

Kovács A, Blaskó B, Mádi A, Fésüs L: Ecetmuslica-transzglutamináz klónozása és vizsgálata. *A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 7. Munkaértekezlete*, Keszthely, 2002. május 14–17.

Blaskó B, **Kovács A**, Mádi A, Fésüs L: Funkcionális transzglutamináz-e a *C. elegans* protein diszulfid izomeráza? *A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 7. Munkaértekezlete*, Keszthely, 2002. május 14–17.

Kovács A, Blaskó B, Mádi A, Fésüs L: Cloning and characterization of the fruit-fly transglutaminase. *7th International Conference on Transglutaminases and Protein Crosslinking Reactions*, Ferrara, Olaszország, 2002. szeptember 14–17.

Kovács A, Blaskó B, Mádi A, Deák P, Fésüs L: Transzglutamináz jellemzése ecetmuslicában. *A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 8. Munkaértekezlete*, Tihany, 2003. május 12–15.

Kovács A, Pál M, Blaskó B, Mádi A, Deák P, Fésüs L: Az ecetmuslica-transzglutamináz jellemzése. *A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 9. Munkaértekezlete*, Sopron, 2004. május 10–13.

Erdei É, Pepó P, Tóth Sz, **Kovács A**, Szabó B: A silócirok (*Sorghum dochna* L.) beltartalmi értékeinek vizsgálata alternatív energia előállítás céljaira. *XIV. Növénynevelési Tudományos Nap*, Budapest, 2008. március 12.

13.1.6. Oktatás, ismeretterjesztés

Kovács A, Fésüs L (2000) Cell death in plants compared to animals. *Proceedings of EMBO Lecture Course Molecular and Cellular Biology: From Plant to Human*, Debrecen (Szerk.: Krasznai Z, Mátyus L, van Duijn B): 8–22.

Pepó P, Tóth Sz, Bódi Z, Kovácsné Oskolás H, **Kovács A**, Erdei É, Szabó E (2007) Szántóföldi növények genetikája, nemesítése és biotechnológiája (Szerk.: Pepó P). Egyetemi jegyzet, Debreceni Egyetem, Debrecen. ISBN 978-963-9732-18-6.

Pepó P, Bódi Z, **Kovács A** (2007) Növénybiotechnológiai praktikum (Szerk.: Pepó P, Bódi Z). Egyetemi jegyzet, Debreceni Egyetem, Debrecen. ISBN 978-963-9732-19-3.

Pepó P, **Kovács A** (2009) Environmental danger of genetic engineering. *Pollution and Water Resources Columbia University Seminar Proceedings* (Szerk.: Halasi-Kun GJ) XXXVIII-XXXIX (2008-2009 Scientific and Social-Institutional Aspects of Central Europe and USA): 286–296.

Kovács A (2009) Szőlőmag olaj – hidegen sajtolt szőlőmag olaj. *Naturland Egészségmagazin* IV/4: 25.