

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**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

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

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

Írta: Kovács András okleveles biológia-kémia tanár és angol szakfordító

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Guttman András, az MTA külső tagja

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. Tőzsér József, az MTA doktora
tagok:	Dr. Idei Miklós, az MTA doktora
	Dr. Bácsi Attila, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2014. május 15., 11:00, a DE ÁOK Biokémiai és
Molekuláris Biológiai Intézet 3.106-os dolgozószobájában

Az értekezés bírálói:

Dr. Kalász Huba, az MTA doktora
Dr. Antal-Szalmás Péter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr. Tőzsér József, az MTA doktora
tagok:	Dr. Idei Miklós, az MTA doktora
	Dr. Kalász Huba, az MTA doktora
	Dr. Antal-Szalmás Péter, PhD
	Dr. Bácsi Attila, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2014. május 15., 13:00, a DE ÁOK
Belgyógyászati Intézet „A” épületének tantermében.

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, poszt-transzlációs 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. CÉLKITÚZÉSEK

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 és közepes koncentrációban lévő plazmafehérjék izolálását és azonosítását megnehezíti. Célom volt egy olyan nagyságú humán plazma proteomkönyvtár létrehozása, mely potenciális betegségmarkerek tárházát jelentheti, és kellő mennyiségű analitot szolgáltathat a plazmában közepes és alacsony koncentrációban megtalálható fehérjék és izotípusaik immunszeparációval egybekötött folyadékromatográfiás-tömeg-spektrometriás 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.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Az Analitkönyvtár előállítása

Az Analitkönyvtár készítéséhez az Innovative Research nevű cégtől 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.

A könyvtárkészítés első lépéseként a legnagyobb mennyiségben lévő plazmakomponenst, a humán szérumalbumint depletáltam *Blue Sepharose affinitáskromatográfiával*. Az 500 ml normál humán plazmát 20 egyenlő, 25 ml-es részletben dolgoztam fel, és az átfolyó frakciókat további frakcionálás céljából összegyűjtöttem.

Az oszlopra kötődött albumint (a hozzá asszociálódott és az állófázishoz kötődő további fehérjékkel együtt) 1 M kálium-kloriddal eluáltam, és a futások között az oszlopot 8 M guanidin-hidrokloriddal regeneráltam. Az albumindepletálási lépés során kapott frakciókat (átfolyó, eluált albumin, regenerálási) SDS-poliakrilamid-gelelektroforézissel (SDS-PAGE) elemeztem, és -70 °C-on tároltam.

Az immunglobulinokat *tiofil interakciós kromatográfiával* vontam ki a plazmából. A 20 Blue Sepharose-kromatográfiás lépés után kapott albumindepletált átfolyó frakcióhoz Pierce Thiophilic Adsorbent gyöngyöt és szilárd kálium-szulfátot adtam (végkoncentráció: 0,5 M). Egy éjszakán át tartó, 4 °C-on végzett kevertetés után az elegyet preparatív gravitációs üvegoszlopba töltöttem, az átfolyó és az első két mosási (0,5 M kálium-szulfáttal) frakciót felfogtam. Az immunglobulinokat 50 mM nátrium-foszfáttal (pH 8,0) eluáltam, majd az oszlopot 8 M guanidin-hidrokloriddal regeneráltam. A depletálási lépésben kapott frakciókat (átfolyó, mosás, immunglobulinok) SDS-PAGE-vel vizsgáltam, és további felhasználásig -70 °C-on tároltam.

Az albumin- és immunglobulin-depletált plazmát 10 kDa pórusméretű Centricon Plus-70 centrifugális koncentrátorcsövekkel *töményítettem*, és a puffert 24 óráig, 4 °C-on végzett *dialízissel* cseréltem 7,4-es pH-jú PBS-re a kálium-szulfát

eltávolítása céljából. A dializálandó minták kb. 96 ml-esek voltak (290 ml plazmaoldat háromfelé osztva), a PBS-oldat pedig 2 liter térfogatú.

A koncentrált, dializált plazmát négy lépésben, *kisózással*, 35, 45, 65 és 75%-os telítettségű *ammónium-szulfáttal* előfrakcionáltam. Az egyes lépéseket 4 °C-on, legalább 1 órán át tartó inkubálással kiviteleztem. A centrifugálással összegyűjtött fehérjecsapadékokat 7,4-es pH-jú PBS-ben oldottam fel, SDS-PAGE-vel elemeztem, és a következő elválasztási lépésig -70 °C-on tároltam.

A 7,4-es pH-jú PBS-ben oldott precipitátumokat *méretkizárásos kromatográfiával (géliszűrőssel)* frakcionáltam tovább, Sephacryl S-200 állófázis alkalmazásával. 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.

A *kationcserés kromatográfia* előtt az összes egyesített géliszűrőssel kapott frakciókon puffercserét hajtottam végre, a PBS-t 5,5-es pH-jú 50 mM foszfát-pufferre cseréltem Amicon Ultra centrifugális szűrők alkalmazásával. Az elválasztáshoz HiTrap HP SP oszlopokat használtam. Az átfolyó frakciókat felfogtam, a kationcserélő gélre kötődött fehérjéket pedig 0-tól 0,5 M-ig lineárisan növekvő koncentrációjú, 5,5-es pH-jú 50 mM foszfát-pufferben oldott kálium-kloriddal eluáltam, és az oszlopra juttatott minták fehérjetartalmának függvényében 0,5 (10 mg fehérjemennyiség alatt) vagy 1 ml-es (10 mg fehérjemennyiség fölött) frakciókat gyűjtöttem, melyek összetételét SDS-PAGE-vel analizáltam, és -70 °C-on tároltam.

Az *anioncserés kromatográfias* elválasztás előtt a kationcsere során gyűjtött átfolyó frakciók pufferét 20 mM, 8,5-es pH-jú TRIS-HCl-re cseréltem Amicon Ultra centrifugális szűrők alkalmazásával. Az elválasztáshoz HiTrap HP Q oszlopokat használtam. Az anioncserélő állófázisra kötődött fehérjéket 0-tól 0,5 M-ig lineárisan növekvő koncentrációjú 20 mM, 8,5-es pH-jú TRIS-HCl-ben oldott kálium-kloriddal eluáltam, és az oszlopra vitt minták fehérjetartalmától függően 0,5 (10 mg fehérjemennyiség alatt) vagy 1 ml-es (10 mg fehérjemennyiség fölött) frakciókat gyűjtöttem, melyeket SDS-PAGE-vel elemeztem, és -70 °C-on tároltam.

A 20 legtöményebb (>8,0 mg/ml) ioncserés elválasztás során gyűjtött frakciót *hidrofób interakciós kromatográfiával* frakcionáltam tovább, HiTrap Phenyl Sepharose HP oszlopok használatával. 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 sóval kicsapott fehérjéket tartalmazóknál 7,1-es pH-jú, 20 mM TRIS-HCl-ben oldott 2 M ammónium-szulfátot használtam. Az oszlopra kötődött fehérjék eluálását 100%-tól 0%-ig lineárisan csökkenő ammónium-szulfátgradiens alkalmazásával végeztem, 1 ml-es frakciókat gyűjtöttem, melyeket SDS-PAGE-vel vizsgáltam, és -70 °C-on tartottam.

3.2. A frakciók kódolása

A frakciók referenciakódja a következőkből tevődik össze: ammónium-szulfát-koncentráció (35, 45, 65 vagy 75), az összeöntött, géliszűrőssel kapott frakció száma (G1-től G4-ig), kation- (C), anioncserés (A) vagy hidrofób interakciós kromatográfiával előállított frakció (H). 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.

3.3. Az Analitkönyvtár karakterizálása: dot blot és Western blot

A vizsgálandó frakció koncentrációjától függően 1 vagy 3 µg fehérjét juttattam a 96 minta befogadására alkalmas DHM-96 *dot blot*készülék kör alakú mintafelvívő nyílásaiba, és XF54 230 50 vákuumpumpa által előállított 10 kPa szívóerőt alkalmazva Protran BA 85 nitrocellulóz-membránra blottoltam. A membránt megszáritottam, 0,5% polivinil-pirrolidont és 0,05% Tween 20-at tartalmazó 7,4-es pH-jú PBS-oldatba (blokkoló puffer) helyeztem, 30 percig blokkoltam, majd

elsődleges monoklonális antitesttel 1 órán át inkubáltam. A membránt 5-ször 1 percre mostam vízzel, ugyanennyi ideig blokkoló pufferrel, végül PBS-T (0,05% Tween 20 PBS-ben oldva) mosóoldattal. Másodlagos ellenanyagként blokkoló pufferben 8000-szeresre hígított, tormaperoxidáz (HRP) konjugált kecske anti-egér IgG-t használtam, és a membránt 1 órán keresztül ráztam. Ezt követően a membránt 5-ször 1 percre mostam PBS-T-vel. A blotot Pierce ECL Western Blotting Substrate-tel hívtam elő, majd Gel Logic 2200 PRO géldokumentációs rendszerrel fényképeztem le. A reakció pozitív kontrolljaként 0,05 µg elsődleges antitestet, negatív kontrollként 3 µl 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-ösrel 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.

Western blot vizsgálatok esetén frakciónként 2 µg fehérjét választottam el SDS-PAGE-vel, majd a fehérjéket Protran BA 85 nitrocellulóz-membránra transzferáltam Mini Trans-Blot Cell blotoló készülékkel. A membránt a dot blotnál is használt összetételű blokkoló pufferben 1 órán át blokkoltam, majd egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltam 5000-szeresre hígított elsődleges monoklonális antitesttel. A dot blotnál részletezett módon mostam a membránt, majd 1 óráig ráztam 5000-szeresre hígított HRP-konjugált kecske anti-egér IgG másodlagos ellenanyagot tartalmazó blokkoló pufferben. A membránt PBS-T-ben mostam, a blotot Pierce ECL Western Blotting Substrate segítségével hívtam elő, és Gel Logic 2200 PRO dokumentációs rendszerrel fényképeztem le. A membránt 10% ecetsavat tartalmazó 0,05%-os amidofekete-oldattal festettem, 2-szer 10 percre mostam 5%-os ecetsavval, majd UVIPro Gold géldokumentációs rendszer segítségével készítettem róla képet.

3.4. Immunprecipitáció, 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. 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 dot blot módszerrel történt szűrések során használt, az ismeretlen antigénnel pozitív reakciót mutató antitesteket protein G-vel összekapcsolt Dynabeads gyöngyökkel 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.

3.5. 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. A specifikus immunprecipitációval kapott fehérjék oldatban történő tripszines emésztése utáni MS-vizsgálatot az MTA Kémiai Kutatóintézetének Szerkezeti Kémiai Intézetében (Budapest) kiviteleztek Q-TOF Premier tömegspektrométerrel, melyet *nanoflow* UHPLC-rendszerhez kapcsoltak.

3.6. 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

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

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

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

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

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

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az Analitkönyvtár előállítása

Az Analitkönyvtárat többlepéses plazmafrakcionálási eljárással hoztam létre, melynek során specifikus depletálási, fehérjekicsapási és kromatográfiás módszereket alkalmaztam.

Első lépésként *a humán szérumalbumint depletáltam* 500 ml emberi vérplazmából, Blue Sepharose-affinitáskromatográfiával. Az elválasztás során 3 frakciót kaptam: (1) az albumindepletált átfolyót, (2) az 1 M KCl-dal eluált albumin- és a (3) 8 M guanidin-hidrokloriddal végzett oszlopregenerálás frakcióját. A frakciók összetételét SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel elemeztem, és azt tapasztaltam, hogy a depletálás eredményeképpen az átfolyó frakcióban az albumintartalom jelentősen lecsökkent. Az eluált albuminfrakcióban a depletált albumin túlnyomó többsége és az albumintól eltérő molekulatömegű fehérjék voltak. Az oszlop regenerálásával kapott frakcióban a guanidin-hidrokloriddal az oszlopról eltávolított fehérjék között találtam még albumint a többi, KCl-dal nem eluálódott fehérje mellett.

Második lépésben *az immunglobulinokat depletáltam* tiofil interakciós affinitáskromatográfiával. A depletálással kb. 3,6 liter térfogatú albumin- és immunglobulin-depletált átfolyó frakciót kaptam. Az adszorbens gyöngyökhöz kötődött immunglobulinokat is eluáltam, összegyűjtöttem és tároltam. Az elválasztás után az átfolyó frakcióban az immunglobulinok mennyisége szignifikánsan csökkent, és az eluált immunglobulin-frakcióban volt detektálható.

Az albumin- és immunglobulin-depletált plazmaoldatot *centrifugális módszerrel koncentráltam*, ezt követően *dializáltam* a K_2SO_4 eltávolítása végett. A koncentráls és dialízis eredményeképpen a depletált plazmaoldat térfogata 335 ml-re csökkent.

Az albumin- és immunglobulin-depletált plazmát 35, 45, 65 és 75%-os telítettségű ammónium-szulfáttal *kisózva előfrakcionáltam*. Az alacsonyabb telítettségű ammónium szulfátos kicsapással (35, 45%) a többségében hidrofób/kevésbé vízdoldható fehérjék csapódtak ki, míg a magasabb telítettségű szinteknél (65, 75%) a kevésbé hidrofób, ezáltal vízben jobban oldódó fehérjék. A 75%-os kisózás után

kapott felülúszó nem tartalmazott kimutatható mennyiségű fehérjét, így ezt az oldatot a továbbiakban nem vizsgáltam.

A 4, fehérjét tartalmazó frakciót *méretkizárásos kromatográfiával (gélszűréssel)* szeparáltam tovább, és a frakciókat a hasonló SDS-PAGE-összetétel alapján – azonos mérettartományba eső fehérjesávok száma és az azonos méretű fehérjék mennyisége – egyesítettem. A Könyvtárkészítés ezen fázisában 14 frakcióval rendelkeztem: 3–3 származott a 35 és 45%-os, míg 4–4 a 65 és 75%-os ammónium-szulfát-precipitátumokból.

A 14 frakciót *kationcserés kromatográfiával* fracionáltam tovább. Az átfolyó frakciókat összegyűjtöttem, az oszlopra kötődött fehérjéket pedig lineárisan növekvő kálium-klorid-gradienssel eluáltam. A kationcsere során 322 frakciót kaptam, melyek már végleges Analitkönyvtár frakciók voltak.

A kationcserés elválasztások során gyűjtött 14 átfolyó frakciót *anioncserés kromatográfiával* szeparáltam tovább. Az oszlopra kötődött fehérjéket ez esetben is lineárisan növekvő KCl-gradienssel eluáltam, és 316 végső frakciót gyűjtöttem. Az anioncserés kromatogramokon több csúcsot láttam, mint kationcserések esetén, és a frakciók SDS-PAGE-elemzése a kationcseréseknél komplexebb frakciókra engedett következtetni, kisebb mértékű átfedésekkel a szomszédos frakciók között. Az átfolyó frakciók nem tartalmaztak kimutatható mennyiségű fehérjét.

A 20 legterményebb (>8,0 mg/ml) ioncserével – mind anioncserés – kapott frakciót *hidrofób interakciós kromatográfiával* szeparáltam tovább. Az oszlopra kötődött fehérjéket lineárisan csökkenő ammónium-szulfát-gradiens alkalmazásával eluáltam, és 145 végső frakciót kaptam, így alakult ki a 783 végső frakciót tartalmazó Analitkönyvtár. Az SDS-PAGE elemzés alapján a nagyobb mértékben hidrofób frakciók (45%-os ammónium-szulfát-telítettség) elválasztása jobb felbontást eredményezett, mint a kevésbé hidrofóbaké (65 és 75%-os ammónium-szulfát-telítettség). Az átfolyó frakciókban nem lehetett fehérjét detektálni.

4.2. Az Analitkönyvtár karakterizálása I.: a D vitaminkötő fehérje szeparációs útjának követése

Az Analitkönyvtár karakterizálásának, egyben alkalmazhatósága megállapításának egyik vizsgálata a D vitaminkötő fehérje szeparációs és dúsulási útjának követése volt dot blot és Western blot módszerrel a könyvtárkészítés elválasztási szintjeiből szelektált frakciókon. Az SDS-PAGE-elemzések által meghatározott komplexitásuk és fehérje-koncentrációjuk alapján a könyvtárkészítés összes elválasztási szintjét reprezentáló 46 frakciót választottam ki. Közülük 8 az első 3 szintből származott: albumin- és immunglobulin-depletált plazma, a 4 ammónium-szulfát-precipitátum és 3 gélszűrőssel nyert frakció. A többi 38 végső frakció volt, 14 kationcserés, 16 anioncserés és 8 hidrofób interakciós kromatográfiás elválasztás során gyűjtött.

A 46 frakciót nitrocellulóz membránra cseppentettem, és a *dot blot reakcióhoz* D vitaminkötő fehérje-specifikus monoklonális antitestet használtam. A jelintenzitásokat 0,5 és 5,0 között értékeltem, 0 értéket azok a frakciók kaptak, melyekben nem lehetett a háttértől nagyobb szignál detektálni.

A 8, kezdeti szintekből származó frakció közül 7 adott 1-2-es intenzitású jelet, míg a 38 végső frakció közül csak 19-ben mutattam ki a fehérjét – 0,5-ös és 1-es erősségű szignálintenzitások –, leginkább a 45 és 65%-os ammónium-szulfát-precipitátumok elválasztásával kaptak, mely arra engedett következtetni, hogy a könyvtárkészítés során a frakciók összetettsége a vártak megfelelően fokozatosan csökkent. A VDBP legnagyobb mértékű dúsulását – 5-ös jelerősség – a 65%-G3-A17-H10 hidrofób interakciós kromatográfiás végső frakcióban tapasztaltam.

A fehérje jelenlétének igazolását a 65%-G3-A17-H10 referenciakódú frakcióban *Western blot*tal végeztem. Elemeztem a 65%-G3-A17-H10-et és szomszédos frakcióit (65%-G3-A17-H8–9, 65%-G3-A17-H11–12), az albumin- és immunglobulin-depletált plazmát, a 65%-os ammónium-szulfát-precipitátumot, a 65%-G3 gélszűrőses és a 65%-G3-A17 anioncserés frakciót. Az analízis az antigén dúsulását mutatta a legkomplexebb frakciótól (plazma) a legkevésbé összetettekig (hidrofób interakciós kromatográfiával nyert végső frakciók).

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

A *Könyvtár átfogó, dot blot szűrését* olyan monoklonális antitestekkel végeztem, melyek antigénjei ismertek, hogy tanulmányozzam és összehasonlítsam különböző plazmafehérjék szeparációs útjait. A kiválasztott antigének – fibrinogén, D vitaminkötő fehérje, haptoglobin, C9 komplement komponens, alfa-2-makroglobulin, hemopexin, humán szérumalbumin – a plazmában nagy koncentrációban lévő fehérjék voltak, hogy intenzív jeleket produkáljanak az akkumuláció követhetősége érdekében. Mindemellett fizikai, kémiai és biokémiai tulajdonságaik nagyrészt tudottak, így össze tudtam hasonlítani a kapott és várt eloszlási mintázatokat; továbbá betegségspecifikus markerek is.

A 783 frakcióból a szűréshez 638-at – 244 kationcserés, 273 anioncserés és 121 hidrofób interakciós kromatográfiával kapott – választottam ki koncentráció és komplexitás alapján. Pozitívnak a 3-nál nagyobb szignálintenzitást produkáló frakciókat tekintettem.

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 *D vitaminkötő fehérje* esetében a korábbiakban bemutatott hidrofób interakciós kromatográfiával kapott végső frakciókon kívül kevésbé intenzív szignálokat figyeltem meg, elsősorban a 45%-, 65%- és 75%-os ammónium-szulfát-precipitátum anioncserével kapott végső frakcióiban, minden mérettartományban.

A *haptoglobin*, a *hemopexin* és a *humán szérumalbumin* esetében szétterülő eloszlásokat tapasztaltam, az antigének az Analitkönyvtár különböző karakterű – hidrofobicitás/hidrofilicitás, méret, alak – frakcióival adtak pozitív jeleket.

Az *alfa-2-makroglobulin* kiemelkedő erősségű pozitív szignálokat a 35 és 45%-os ammónium-szulfát-precipitátumok szeparálásával kapott legnagyobb molekulatömegű fehérjéket tartalmazó frakciókban produkált, míg kevésbé erőseket a 45%-G2 és 45%-G3 anioncserés és 45%-G2 hidrofób interakciós kromatográfiás elválasztása során gyűjtött frakciókban.

A *C9 komplement komponens*-specifikus monoklonális ellenanyaggal végzett vizsgálat során egyik végső Analitkönyvtár-frakció esetében sem kaptam értékelhető pozitív szignált. A kísérletet elvégeztem a könyvtárkészítés kezdeti fázisaiban kapott frakciókkal – albumindepletált plazma, kálium-kloriddal eluált albuminfrakció, a Blue Sepharose-oszlop regenerálásával kapott frakció, albumin- és immunglobulin-depletált plazma és a tiofil oszlop (immunglobulin-depletálás) első mosási frakciója –, és ennek eredményeképpen az antitest erős pozitív reakcióját (5-ös intenzitás) tapasztaltam a KCl-os elúcióval kapott (albumin és egyéb fehérjék), míg gyengébbet (3-as erősség) a regenerálási frakcióval.

4.4. Az Analitkönyvtár felhasználása monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosításra

A *monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosítást* több lépésben végeztem, melyek a következők voltak: (1) a fentiekben bemutatott 638 frakció átfogó dot blotszűrése olyan monoklonális ellenanyagok keverékével, melyeknek antigénjei ismeretlenek, majd (2) a legerősebb pozitív jeleket mutató frakciók reagáltatása a keverékben található egyedi ellenanyagokkal, szintén dot blottal.

Összesen 21 antitestet vizsgáltam 3 keverékre elosztva (6-, 10- és 5-tagú). A 10-tagú keverék esetén egy közbenső lépést is beiktattam az egyedi szűrés elé, 3 keverékre (2x3- és 1x4-tagú) osztottam a 10 antitestet.

A második szűrés után a legerősebb szignálokat produkáló frakciókat választottam ki antigénazonosításra, koncentrációjuk és összetettségük alapján. Azonosításra előkészítésüket a BioSystems International Kft. munkatársainak közreműködésével végeztem. A kiválasztott frakciók Western blot elemzése során az ellenanyaggal reagáló fehérje molekulatömegét vizsgáltuk. A frakciók immunprecipitációs tisztítása után az eluátumot SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel elemeztük. Az immunprecipitált fehérjéket gélből kivágás után vagy oldatban emésztették tripsinnel és végezték el tömegspektrometriás azonosításukat. A kísérletek eredményeképpen 8 monoklonális antitesthez tartozó antigént sikerült azonosítani. Bsi0051 – D vitaminkötő fehérje, Bsi0080 – alfa-1-antitripszin, Bsi0099 – cöruoplazmin, Bsi0115 – alfa-2-antiplazmin, Bsi0142 – alfa-1-antikimotripszin,

Bsi0144 – alfa-1-antikimotripszin, Bsi0177 – cöroloplazmin, Bsi1521 –
transztiretin.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az Analitkönyvtár előállítása

Munkám első fázisában előállítottam egy 783 frakcióból álló Analitkönyvtárat, mely a humán plazmaproteom átfogó frakcionálásával készült. Többlépéses frakcionálást alkalmaztam, mely módszer alkalmazása elősegíti a plazmában alacsony és közepes koncentrációban lévő fehérjék dúsulását, ezáltal megkönnyítheti azonosításukat. A Könyvtár készítéséhez különböző depletálási – Blue Sepharose-affinitás-kromatográfia az albumin, tiofil interakciós kromatográfia az immunglobulinok kivonásához –, kicsapási (ammónium-szulfátos kisózás) és kromatográfias módszereket – méretkizárásos, kationcserés, anioncserés, hidrofób interakciós – használtam. A szeparálási lépések a fehérjék több fizikai, kémiai, biokémiai tulajdonságán alapultak (oldékonyság, méret, töltés) annak érdekében, hogy a keletkező végső frakciók minél különbözőbb karakterűek legyenek. A kísérleti körülményeinek beállításánál törekedtem megőrizni a plazmafehérjék natív állapotát a monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosítási vizsgálatokhoz. A különböző elválasztási lépések után kapott frakciók SDS-PAGE-képei mutattak átfedéseket egyes szomszédos frakciók esetében, azonban az azonos molekulatömegnél detektált fehérjesávok nem feltétlenül jelenthettek azonos fehérjéket is. A Coomassie-festésnél érzékenyebb detektálási módszerek kimutathatnak kis mennyiségben lévő fehérjéket is, melyek előfordulhatnak akár kizárólag egy vagy csak néhány frakcióban. A frakcionálás előrehaladtával a frakciók komplexitásának folyamatos csökkenését is meg tudtam figyelni, ahogy azt előzetesen vártam is. Mindezek alapján az Analitkönyvtárat további vizsgálatokhoz megfelelőnek lehetett ítélni.

5.2. Az Analitkönyvtár karakterizálása

Az Analitkönyvtár jellemzését és monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosításra való alkalmasságának vizsgálatát többféle módon végeztem. A D vitaminkötő fehérje szeparációs útját elemeztem az elválasztás különböző

szintjeiben, 46 frakcióban, dot blottal és Western blottal, D vitaminkötő fehérje-specifikus monoklonális antitesttel. A dot blotvizsgálatok eredményeképpen találtam olyan frakciót, melyben az antigén dúsulását tapasztaltam (65-G3-A17-H10). A frakció, a szomszédos frakciók és a szeparációs vonalon található közbenső Analitkönyvtár frakciók Western blot elemzése a D vitaminkötő fehérje fokozatos dúsulását mutatta. Ez az eredmény a későbbi, antigénazonosítási vizsgálatok szempontjából biztató volt, lévén beigazolta azt a feltevést, hogy lesznek olyan, kisebb komplexitású végső frakciók, melyekben egyes antigének akkumulációját lehet majd tapasztalni, ami specifikusabb, könnyebb fehérjeazonosítást tehet majd lehetővé, mint komplexebb biológiai minták, pl. a széles dinamikus koncentrációtartománnyal rendelkező plazma analízise.

Az Analitkönyvtár további karakterizálása során átfogó dot blot szűrést végeztem olyan monoklonális antitestekkel, melyek antigénjei nagy koncentrációban vannak jelen a plazmában, fizikai, kémiai, biokémiai tulajdonságaik (hidrofóbicitás/hidrofilicitás, alak, méret, asszociativitás) ismertek, és potenciális biomarkerek is lehetnek.

A *fibrinogén* eloszlása megfelelt a vártaknak. A fehérje kicsapható az általam alkalmazottnál alacsonyabb koncentrációjú (22,5%) ammónium-szulfáttal is, molekulatömege pedig 340 kDa, így a 35%-os ammónium-szulfát-precipitátumból eredeztethető legnagyobb mérettartományban (G1) lévő frakciókban dúsult. 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 miatt fordulhatott elő a komplex méretének megfelelő közepes (G2) mérettartományban. Kötődése lehetséges a nagyon alacsony denzitású lipoproteinekkel (VLDL), így akkumulálódhatott a legmagasabb molekulatömegű (G1) frakciókban is. A humán populációkban a D vitaminkötő fehérjének három elterjedt polimorfizmusa van. 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, melyek molekulatömegei 86 kDa-tól egészen 900 kDa-ig terjedhetnek. 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 haptoglobin mindemellett nagy affinitással kötődik a hemoglobinhoz. A komplexek a kötésben nem lévő fehérjétől eltérő hidrofil/hidrofób karaktert is mutathatnak, melynek eredményeképpen a Könyvtár különböző tulajdonságokkal rendelkező végső frakcióiban is dúsulhatnak, amelyre az állomány tapasztalt eloszlás is következtetni enged.

A *C9 komplement komponens*-specifikus antitesttel végzett elemzések rávilágítottak annak lehetőségére, hogy fehérjék a plazma legnagyobb mennyiségben jelenlévő 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 az irodalomból is ismert jelenség. A kezdeti depletálási lépések során gyűjtött, frakciók vizsgálata során lehetőség nyílt 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 (720 kDa a molekulatömege), így akkumulációja a nagyobb molekulatömegű fehérjéket tartalmazó (G1) frakciókban

szintén megfelelt a kísérlet előtt feltételezettnek. Előfordulása az alacsonyabb mérettartományú frakciókban lehet proteolízis vagy még nem ismert jelenség eredménye.

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), ekvimoláris sztöchiometriával. 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. 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).

A *humán szérumalbumin* közismert tulajdonsága, hogy a plazmában fehérjéken kívül számos, különböző típusú molekulához, pl. zsírsavakhoz, szteroid hormonokhoz, vitaminokhoz, aminosavakhoz vagy bizonyos metabolitokhoz kötődik. 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.

A vizsgálatok többféle kimenetelűek voltak, de elmondható, hogy az antigének eloszlása többségében megfelelt a fehérjék ismert jellemzői alapján vártaknak, és/vagy irodalmi adatok alapján megmagyarázható volt. Az Analitkönyvtárat mindezek alapján monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosításra alkalmasnak ítéltük.

5.3. Monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosítás

Az antigének kiválasztását és előkészítését monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosításra többlépcsős kísérletben végeztem. A Könyvtárát dot blot módszerrel reagáltattam olyan monoklonális antitestekkel, melyek antigénjei ismeretlenek. A szűrés során pozitívnak ítélt frakciók esetében együttműködő és szolgáltató partnerek segítségével az immunprecipitáció, SDS-PAGE-analízis, Western blot, tömegspektrometriás elemzés munkafolyamatot alkalmaztuk, és a kísérletben vizsgált antitestekhez tartozó antigének közel felét (8) sikerült meghatározni, mely nagyon jó aránynak minősül, és reményteljesnek mondható annak érdekében, hogy a fentebb részletezett eljárást alkalmazni lehessen a jövőben, mint akár a biomarkerkutatások egyik lehetséges eszközét.

5.4. A vizsgálatok tapasztalatainak összegzése

Kísérleteim eredményei azt mutatták, hogy a kidolgozott módszer megfelelt a kitűzött célnak, alkalmasnak bizonyult monoklonális antitest-proteomikai alapú antigénazonosításra. A többlépcsős plazmafrakcionálással (Analitkönyvtár-készítés) elértem, hogy a plazmánál jóval kisebb komplexitású, kellően nagyszámú frakció álljon rendelkezésemre a további vizsgálatokhoz. A Könyvtár átfogó dot blot szűrése 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.

6. 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, jellemzése 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 immunglobulinmentesítettem, majd növekvő koncentrációjú ammónium-szulfátos kicsapással előfrakcionáltam. A precipitátumokat gélszűrővel, 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.

7. 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.

8. KÖZLEMÉNYEK

8.1. 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

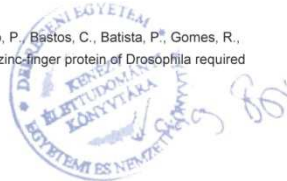
A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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., Győri, 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



8.2. Egyéb közlemények

8.2.1. 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.

8.2.2. 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.

8.2.3. 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.

8.2.4. 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.

8.2.5. 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 silőcirok (*Sorghum dochna* L.) beltartalmi értékeinek vizsgálata alternatív energia előállítás céljaira. *XIV. Növénynemesítési Tudományos Nap*, Budapest, 2008. március 12.

8.2.6. 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.

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.