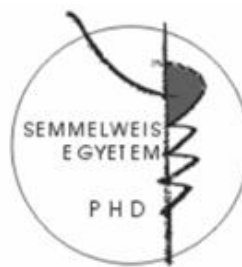


# **Extracelluláris vezikulum fehérjék tömegspektrometriai vizsgálata**

Doktori tézisek

**dr. Turiák Lilla**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Vékey Károly osztályvezető, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Kalász Huba egyetemi tanár, DSc  
Dr. Márk László egyetemi docens, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás egyetemi tanár, DSc

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lelik László egyetemi docens, CSc  
Dr. Riba Pál egyetemi adjunktus, PhD

Budapest  
2012

## Bevezetés

A többsejtű élőlények sejtek közötti kommunikációjának legismertebb módja a kémiai transzmisszió, amikor a sejtek által szekretált kismolekula vagy fehérje transzmitterek környező vagy távolabbi sejteken található receptoraikhoz kötődve fejtik ki hatásukat. Az elmúlt időben a sejt-sejt kommunikáció egy újabb változata keltette fel a kutatók figyelmét és került az érdeklődés középpontjába. Ismertté vált, hogy a sejtek extracelluláris vezikulumok kibocsátásával is küldhetnek információt. Az extracelluláris vezikulumok foszfolipid kettős réteggel határolt nanométer méretű szubcelluláris struktúrák, melyek a gazdasejt citoszoljából származó különböző molekuláris alkotókat (pl. fehérjéket, mRNS-t, miRNS-t) tartalmaznak. Ezen vezikulumok különböző módon képesek befolyásolni a környező célsejtek tulajdonságait. Mivel a különféle molekuláris alkotók egyidejűleg hatnak a célsejtekre, komplexebb, gyorsabb és hatékonyabb működésváltozást eredményezhetnek, mint ami a klasszikus receptor-ligand kölcsönhatás esetén elérhető lenne. A vezikulumok rendkívüli jelentőségét igazolja a különféle biológiai, immunológiai folyamatokban betöltött szerepük (pl. tumor patogenezis, autoimmun megbetegedések, fertőző ágensek terjesztése, T-sejtek számára történő antigén prezentálás, intercelluláris kommunikáció, immunmoduláló hatás, stb.).

A vezikulumokban található fehérjék azonosítására elsősorban a tömegspektrometriai módszereket alkalmazzák, kihasználva a technika kitűnő érzékenységét és felbontóképességét. Ahhoz, hogy az extracelluláris vezikulumokban található fehérjéket tömegspektrometriával vizsgálni lehessen, elsőként a fehérjéket ki kell nyerni a vezikulumokból. A komplex biológiai minták fehérje komponenseinek vizsgálatára általánosan a „bottom up” eljárást alkalmazzák, amely során a fehérjék emésztését követően nyert peptidfragmensek kerülnek elválasztásra és meghatározásra leggyakrabban nanoUHPLC-MS(MS) segítségével.

Meglepő módon thymus (csecsemőmirigy) eredetű extracelluláris vezikulumok proteomikai vizsgálatáról mindeközéig nem számoltak be a szakirodalomban. Tekintve a thymus kiemelt szerepét az immunsejtek érésében és az immunválasz kialakulásában, a thymus eredetű mikrovezikulumok és apoptotikus testek proteomikai jellemzése nagyban elősegítheti ezen szubcelluláris szerkezetek biológiai jelentőségének és funkcióinak megértését.

## Célkitűzés

Kutatómunkám során az irodalomban eddig kevésbé vizsgált extracelluláris vezikulum típusok: a mikrovezikulumok és apoptotikus testek fehérje összetételének meghatározásával foglalkoztam. A Semmelweis Egyetem Genetikai-, Sejt-, és Immunbiológiai Intézetével együttműködésben végzett munkám elsődleges célja az általuk izolált thymus eredetű mikrovezikulumok és apoptotikus testek fehérjeösszetételének meghatározása volt. További célunk volt az azonosított fehérjék alapján a vezikulumok biológiai funkcióinak, valamint a csecsemőmirigy működés szabályozásában betöltött szerepének értelemezése.

A rendelkezésre álló rendkívül kis mintamennyiség miatt a vezikulumok sikeres analitikájához nélkülözhetetlen módszerek, protokollok kidolgozása is szükséges volt, így

- a vezikulumok sikeres, és a később alkalmazandó LC/MS analitikát nem zavaró feltárására,
- olyan emésztési protokoll kidolgozása, mely jól alkalmazható kis összfehérje mennyiségű minta kis térfogatban történő proteolízisére és amely alkalmas különböző komplex biológiai minták minor fehérje komponenseinek hatékony azonosítására is.

## Módszerek

A vezikulumok membránjának felbontására és a fehérjék kiszabadítására három különböző módszert próbáltam ki és hasonlítottam össze. A módszerek a következők voltak: *i*) a vezikulumok felbontása felületaktív anyag alkalmazásával, *ii*) gélelektroforézis és gélben történő emésztés és *iii*) a vezikulumok felbontása fagyasztás-olvasztás ciklusok alkalmazásával. Legjobb módszernek a fagyasztás-olvasztás ciklusok alkalmazása bizonyult. A végső módszer, melyet a vezikulumok felbontására használtam a következő volt: 8  $\mu\text{L}$  vezikulum mintához 2 pmol béta-laktoglobulin (BLG) belső standardot (2  $\mu\text{L}$  térfogatban) adtam. A fagyasztás-olvasztás eljárás során 5 ciklus folyékony nitrogént (30 s) és két ciklus - 20 °C-on (1 óra) történő fagyasztást alkalmaztam [1].

A kismennyiségű komplex biológiai minták fehérjéinek emésztésére három protokollt vizsgáltam és hasonlítottam össze modell mintán, ami humán plazma és BLG keveréke volt. Ezen protokollok közül kettő irodalmi módszer, melyeket módosítás nélkül használtam (A és B protokoll), egy pedig az új, általam kidolgozott „Mini” protokoll volt [2]. Az alkalmazott emésztési protokollok paramétereit az 1. táblázatban foglalom össze.

### 1. táblázat Az alkalmazott emésztési protokollok

		A protokoll	B protokoll	"Mini" protokoll
<b>Kiindulási mintatérfogat</b>		<b>60 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>12 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>10 <math>\mu\text{L}</math></b>
<b>Mintakomponensek</b>	<b>Plazma</b>	<b>0,04 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>0,04 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>0,004 <math>\mu\text{L}</math></b>
	<b>(Albumin</b>	<b>30 pmol</b>	<b>30 pmol</b>	<b>3 pmol)</b>
	<b>BLG</b>	<b>20 pmol</b>	<b>20 pmol</b>	<b>2 pmol</b>
<b>Reagensek, végkoncentráció</b>				
	<b>RapiGest</b>	<b>0,16 %</b>	<b>0,08 %</b>	<b>0,008%</b>
	<b>DTT</b>	<b>5,3 mM</b>	<b>8,3 mM</b>	<b>2 mM</b>
	<b>Jódacetamid</b>	<b>17,8 mM</b>	<b>10,5 mM</b>	<b>6,6 mM</b>
	<b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub></b>	<b>17,8 mM</b>	<b>52,6 mM</b>	<b>33 mM</b>
<b>Tripszin: fehérje arány</b>		<b>1:25</b>	<b>1:25</b>	<b>1:2,5</b>

„Mini protokoll”: 10  $\mu\text{L}$  vizsgálati mintát tartalmazó oldathoz (2  $\mu\text{L}$  500 x hígított humán plazma és 2 pmol BLG oldat vízben), illetve feltárt mikrovezikulum vagy apoptotikus test mintához 1  $\mu\text{L}$  0,13% RapiGest-et és 33 mM ditiotreitolt (DTT) tartalmazó reagens keveréket adtam és a mintákat 60 °C-on 30 percig termosztáltam. Redukálást követően, alkilálás céljából a mintához 3  $\mu\text{L}$  33 mM jódcetamidot és 167 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -ot tartalmazó oldatot adtam és a mintákat szobahőmérsékleten 30 percig sötétben tároltam. A fehérjék peptidekre hasítását tripszin (0,5  $\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{M}$ ) hozzáadásával biztosítottam és a mintát 37 °C-on 90 percig inkubáltam. Ez a tripszin mennyiség 1:2,5 enzim:fehérje aránynak felel meg, mely tízszer nagyobb az A és B protokoll esetében alkalmazott aránynál. Az emésztés leállítására és a RapiGest elbontására a mintához 0,5  $\mu\text{L}$  hangyasavat adtam és 37 °C-on 30 percig inkubáltam. Ezt a minták 10 percig tartó centrifugálása követte 13 500 rpm alkalmazásával. A centrifugálást követően a vízben oldhatatlan felülúszót eltávolítottam, majd a megmaradó tiszta oldatot átpipettáztam egy üvegedénybe. Az emésztést követően a minta végtérfogata 15  $\mu\text{L}$  volt.

A plazma illetve az extracelluláris vezikulum peptidjeinek elválasztása a sómentesítést követően fordított fázisú, C18-as kapilláris oszlopon történt NanoAcquity UPLC System (Waters, Manchester, UK) kromatográfiás rendszer alkalmazásával. A fehérjék azonosítása tandem tömegspektrometriával Waters QTOF Premier tömegspektrométeren (Waters, Manchester, UK) történt. A felvétel pozitív ionizációs módban 400–2000 m/z tömegtartományban készült 4 s ciklusokat használva, mely ciklus egy teljes spektrumból és a 3 legintenzívebb ion MS/MS spektrumából állt. A kísérlet során nyert spektrumok feldolgozását a ProteinLynx GlobalServer (Waters, Milford, MA, USA) szoftverrel végeztem. A feldolgozott spektrumokat a Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com), Matrix Science, London) és X! Tandem (The GPM, thepgm.org; version 2007.01.01.1) programokkal értékeltem ki.

Az extracelluláris vezikulum fehérjék azonosítása esetén *Mus musculus* (házi egér) taxonómiát és a SwissProt szekvencia adatbázist használtam. A keresés során egy kihagyott hasítási helyet engedélyeztem, fix módosulásként a ciszteinek jódcetamid származékát, míg lehetséges módosulásként a metionin aminosavak oxidációját, valamint a szerin, treonin és tirozin aminosavak foszforilációját állítottam be. Az anyaionok esetén 50 ppm toleranciát, míg a fragmens ionok esetén 0,15 Da tömeg toleranciát engedélyeztem. Az MS/MS alapú peptid és fehérje azonosítás eredményeit Scaffold programmal (Proteome Software Inc., Portland, OR) validáltam. A peptidek közül a 95%-nál ( $p < 0,05$ ) nagyobb valószínűséggel azonosítottakat fogadtam el, a fehérjék esetén pedig a 99%-nál ( $p < 0,01$ ) nagyobb valószínűséggel azonosítottakat, legalább két egyedi peptidfragmens azonosítása esetén.

A plazma fehérjék azonosítása esetén *Homo sapiens* taxonómiát és a SwissProt szekvencia adatbázist használtam. A kihagyott hasítások és nem specifikus peptidfragmensek azonosítása is Mascot program segítségével történt. A fehérjéket két kritérium alapján azonosítottuk. A „szigorú” követelmény esetén legalább két 34-es ( $p < 0,005$ ) „Mascot ion score”-al rendelkező peptidfragens azonosítása szükséges. A „laza” követelmény esetén a 24-es pontszámmal ( $p < 0,05$ ) rendelkező fehérjéket is elfogadtuk és egy peptidfragens azonosítása is elegendő volt. A jelintenzitások meghatározása a kromatográfiás futásokból történt MS üzemmódban. A mennyiségi becslésekre a különböző peptidfragmensek ionkromatogramjainak csúcsterületeit használtam. A kidolgozott protokollok teljesítőképességét a következő mérőszámokkal jellemeztem: (a) azonosított fehérjék száma: a fehérjék azonosítása szekvencia darabokon (MS/MS) alapul, a fentebb említett két kritérium („laza” és „szigorú”) alapján, (b) a HPLC-MS kromatogramon észlelt jelintenzitások összehasonlítása. A különböző fehérjékhez tartozó kiválasztott peptidek csúcsterületeit külön HPLC-MS futásokból határoztam meg.

A mikrovezikulumokban és apoptotikus testekben található hiszton mennyiségét egy „jelzés nélküli” eljárással hasonlítottam össze. Az adott fehérje három legintenzívebb peptidje jelintenzitásainak átlagát az ismert mennyiségű belső standard, a BLG három legintenzívebb peptidje intenzitásának átlagához hasonlítottam a nanoUPLC-MS futás során. Mivel a belső standard koncentrációja az oldatban ismert volt, lehetővé vált a kvantitatív becslés.

## Eredmények

Az extracelluláris vezikulumok tömegspektrometriai vizsgálatáról szóló irodalom a vezikulumok feltárásával kapcsolatban igen szűkszavú. A módszer fejlesztés során a vezikulumok membránjának felnyitására és a fehérjék kiszabadítására három eljárást hasonlítottam össze. Az első esetben a membrán vezikulum frakciót felületaktív anyag hatásának tettem ki, különböző koncentrációjú Triton-X 100-at és SDS-t alkalmaztam. A felületaktív anyagok használatának nagy hátránya azonban, hogy a vezikulumok membránjának felbontásához szükséges koncentrációban már zavarják a tömegspektrometriás méréseket. A detergenspektrumban észlelt jelei elnyomják a vezikulumok fehérjéinek jeleit és nem tudtam a tandem tömegspektrometriai mérések alapján vezikulumokból fehérjéket azonosítani. A következő módszer, amelyet kipróbáltam, a minta közvetlen SDS poliakrilamid gélen történő futtatása volt, mivel az irodalomban ez a leggyakrabban alkalmazott módszer. A minta-előkészítés azonban elég hosszadalmas 46 lépés, körülbelül 2 napot vesz igénybe. További hátrány, hogy a peptidek gélből történő extrakciója hibákkal terhelt, valamint a kivágott gélcsíkok számának megfelelő nanoUPLC-MS(MS) felvétel szükséges, ami az áteresztőképesség csökkenéséhez vezet. Ezért kevésbé időigényes és kevesebb hibával terhelt minta-előkészítési eljárást szerettem volna kidolgozni, amit a fagyasztás-olvasztás ciklusok alkalmazásával próbáltam elérni. A módszer kidolgozása során különböző számú ciklusokat és különböző fagyasztási lépéseket használtam. Ezek közül az öt ciklus folyékony nitrogént (30 s) és a két ciklus  $-20^{\circ}\text{C}$ -on (1 óra) történő fagyasztást tartalmazó módszert találtam a legmegfelelőbbnek. A feltárási módszereket összehasonlítottam a legfontosabb paraméterek alapján: minta-előkészítési lépések száma és az egy mintából azonosított fehérjék száma. A paraméterek alapján a fagyasztás-olvasztás ciklusok alkalmazása bizonyult a legjobbnak. Ez a módszer tehát gyorsnak, egyszerűnek és hatékonynak bizonyult a vezikulumokban található fehérjék kiszabadítására.

Következő céloom olyan emésztési protokoll kidolgozása volt, mely jól alkalmazható kis összfehérje mennyiségű minta kis térfogatban történő emésztésére. A tripszines emésztés a proteomikai vizsgálatok kulcslépése, az irodalomban számos protokollt használnak. Míg a nmol mennyiségű fehérjék 100-500  $\mu\text{L}$  térfogatban történő emésztése rutinszerű, addig a kis mennyiségű fehérjekeverékek (fmol és pmol mennyiség) oldatban történő emésztése nem megoldott. Annak érdekében, hogy azonosítani tudjam a vezikulumban kis mennyiségben található fehérjéket, olyan módszer kifejlesztése volt a céloom mely jól működik:

- kis minta térfogatokkal

- amikor az összfehérje mennyiség limitált (<5 pmol)
- lehetővé teszi fehérjekeverékek minor komponenseinek azonosítását
- fél-quantitatív eredményeket szolgáltat

A protokoll kidolgozásához modell mintakeverékként kezeletlen, hígított plazma minta és BLG belső standard keverékét használtam. A plazma számos komponenssel rendelkezik, így felhasználható bonyolult keverékek modellezésére. A belső standard két szempontból jelentős: egyrészt kompetitív adszorpció révén megakadályozhatja a keverék kis komponenseinek kitapadását az edényzet falára, másrészt segítségével fél-quantitatív eredményeket kaphatunk. A kidolgozott protokoll során 10 µL mintát emésztettem, mely 50-5000 fmol mennyiségű fehérjekeveréket tartalmazott. Az emésztés egyes lépéseinek elvégzését követően a minta alig hígul fel, hiszen a térfogat csak 5 µL -rel nő meg.

A módszer optimalása során változtattam az egyes reagensek mennyiségét, s azt tapasztaltam, hogy a nagy mennyiségű denaturálószer (RapiGest) nehezíti a kis komponensek azonosítását ezért csökkentettük mennyiségét az irodalomban szereplő protokollokhoz képest. Változtattuk a redukálószer (DTT) és alkilálószer (jóacetamid) mennyiségét is, de ezek a paraméterek nem befolyásolták jelentősen az eredményeket. Ezt követően a tripszin:analit arányt és az emésztés idejének hosszát vizsgáltuk. Eredményeink szerint a nagyobb tripszin:analit arány előnyösebb a kisebb fehérjekomponensek azonosításában, ezért az 1:2,5 arányt alkalmaztuk és az emésztés ideje 90 perc volt.

A kidolgozott „Mini” protokollal kapott eredményeket két, az irodalomban leírt nagy mennyiségű fehérje emésztésére alkalmas protokoll eredményeivel vetettük össze. Továbbá elvégeztük a kismennyiségű minta nagy térfogatban történő emésztését, majd bepárlását és visszaoldását kis térfogatban. Minden esetben azonos mennyiségű triptikus emésztményt injektáltunk az oszlopra. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a „Mini” protokoll teljesítőképessége legalább olyan jó, mint az általánosan ismert protokolloké.

Ellenőriztük továbbá a „Mini” protokoll reprodukálhatóságát is; a választott csúcsintenzitások esetén a szórás 8,3% volt, míg az azonosított fehérjék száma 16 és 20 között változott. Ez a pontosság a legtöbb proteomikai vizsgálat esetén teljesen elfogadható, különösképpen, ha figyelembe vesszük, hogy az emésztés során több esetben is 1 µL térfogatú reagenst adtam a mintához.

A thymus az egyik fő immunszerv és kiemelt szerepet játszik az immunsejtek érésében és az immunválasz kialakulásában. Fontosnak tartottuk tehát a thymus sejtek által szekretált mikrovezikulumok és apoptotikus testek fehérjéinek azonosítását. A fehérjék azonosítása a peptidekről készült tandem tömegspektrumok alapján az irodalomban leírt legszigorúbb követelmények szerint történt. Ilyen módon 142 fehérjét azonosítottam az egér



thymus sejtekből származó apoptotikus testekben és 195 fehérjét a mikrovezikulumokban. Az azonosított fehérjék nagy része meglepő módon átfedést mutatott a két populáció között (47%). Mindkét populációban sikerült azonosítani többek között citoszkeletális (aktin és tubulin) és citoszkeletális kötőfehérjéket (ezrin, moezin, kofilin-1), metabolikus enzimeket (gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz, alfa-enoláz, malát-dehidrogenáz1) és dajkafehérjéket (T-komplex fehérje alegységek, hsp90). A vezikulumokban azonosított fehérjék biológiai relevanciáját igazolja, hogy a fehérjék nagy részét korábban más eredetű vezikulum típusokban is azonosították már.

A vezikulumokban azonosított fehérjék alátámasztják a vezikulumok kommunikációban betöltött szerepét. Számos olyan fehérjét azonosítottam, melyekről korábban már igazolták, hogy autoantigének humán autoimmun megbetegedésekben. Mindkét populáció tartalmazott egy glikolitikus enzimet az alfa-enolázt, melyről feltételezik, hogy szerepet játszik a rheumatoid arthritiss és egyéb autoimmun betegségek patomechanizmusában. Sikerült továbbá hősokk fehérjéket is azonosítanom, melyek feltételezhetően atherosclerosisban játszanak szerepet, mint autoantigének.

A vizsgálat másik érdekes eredménye a vezikulumokban kulcsfontosságú szabályozó és jelző molekulák, mint például az elongációs faktor 2 (EF2) azonosítása. Az EF2 a transzkripció faktorok egyik csoportját képezi; feladatai közé tartozik a sejtciklus szabályozása, az emlős sejtekben a DNS szintézise, tumorigenezis, apoptózis és differenciáció. Egy másik szabályozó molekula, melyet a thymus eredetű vezikulumokban azonosítottunk a tirozin-protein kináz lck (LCK). Ez a molekula elengedhetetlen szerepet játszik a T-sejt receptor (TCR)- kapcsolt jelátviteli folyamatban. Éppen ezért ez a molekula különös jelentőségű a thymusban fejlődő T-sejtek kiválasztásában és érésében, valamint az érett T-sejtek funkcióiban.

Meglepő módon mind a mikrovezikulumok mind az apoptotikus testek jelentős mennyiségű hisztonot tartalmaztak. Elvégeztem néhány kvantitatív becslést is a mintákban található hisztonok mennyiségének összehasonlítására. A hisztonok relatív mennyisége az apoptotikus testekben az összfehérjék 20,3%-a, míg a mikrovezikulumok esetén 6,1%. A hisztonok mennyisége az apoptotikus testekben nem meglepő, ha a képződésük mechanizmusára gondolunk. Meglepő módon azonban a mikrovezikulumokban is nagy mennyiségű hiszton fehérjét azonosítottam. Feltételezhetőleg a thymus eredetű mikrovezikulumok egy része apoptózis során képződik.

## Következtetések

1. Megoldottam vezikulumok feltárását, mely a később alkalmazandó nanoUPLC-MS(MS) analitikát nem zavarja és számos előnnyel rendelkezik a szokásos gélelektroforézishez képest. A módszer fagyasztás-olvasztás ciklusok alkalmazásán alapul, és segítségével körülbelül négyszer több fehérjét azonosítottam a vezikulum mintákban, mint gélelektroforézis alkalmazása esetén.
2. Kidolgoztam egy miniatürizált tripszines emésztési protokollt („Mini protokoll”), mely jól alkalmazható kis összfehérje mennyiségű minta kis térfogatban történő emésztésére és amely alkalmas különböző komplex biológiai minták minor fehérje komponenseinek hatékony azonosítására. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a „Mini protokoll” legalább olyan eredményes, mint a „standard” protokollok. Az eredmények azt mutatják, hogy ennek segítségével még 100 fmol (10 ng) mennyiségű fehérjekeverék is jól kezelhető. Az emésztést követő HPLC-MS/MS vizsgálat során ebben a keverékben 10-20 fmol mennyiségben jelen levő minor fehérjekomponensek is kimutathatók. A kidolgozott protokoll a gyakorlati proteomika egyik fontos problémáját oldja meg. A kidolgozott protokoll segítségével kis mennyiségben rendelkezésre álló minták is analizálhatók, ez tette lehetővé extracelluláris vezikulumok vizsgálatát.
3. A kidolgozott munkafolyamat segítségével sikeresen azonosítottam egér thymus eredetű extracelluláris vezikulumok fehérjéit. Apoptotikus testekben 142, mikrovezikulumokban pedig 195 fehérjét azonosítottam. Megállapítottam, hogy az apoptotikus testek és mikrovezikulumok fehérjéi nagy részben azonosak. Az azonosított fehérjék alapján több, biológiai szempontból jelentős következtetést tudunk levonni. Számos olyan fehérjét azonosítottam, melyekről korábban már igazolták, hogy autoantigének humán autoimmun megbetegedésekben. A vizsgálat másik érdekes eredménye kulcsfontosságú szabályozó és jelzőmolekulák, mint például az elongációs faktor 2 (EF2) azonosítása a vezikulumokban.
4. A mikrovezikulum és apoptotikus test mintákban meghatároztam a hisztonok mennyiségét „jelzés nélküli” kvantifikálással a peptidfragmensek ionkromatogramjainak csúcsterülete alapján. Az azonosított hisztonokat hiszton-családokba soroltam és ezek mennyiségét szintén meghatároztam. Megállapítottam, hogy a vizsgált esetben mindkét típusú vezikulum főleg apoptózis során képződik.

## Összefoglalás

A Semmelweis Egyetem Genetikai-, Sejt-, és Immunbiológiai Intézetével együttműködésben végzett munkám során thymus eredetű mikrovezikulumok és apoptotikus testek fehérje összetételét határoztam meg folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás módszerrel. Számos, az immunrendszerben kulcsfontosságú molekula jelenlétét azonosítottam a vezikulumokban. Ez arra utal, hogy létezik kétirányú extracelluláris vezikulumok által közvetített párbeszéd az érő T-sejtek és az antigén prezentáló thymus sejtek között [1].

A kis mennyiségben rendelkezésre álló vezikulumok, illetve az ebből kinyerhető komplex fehérjeminták analízisének több problematikáját megoldottam. Módszert dolgoztam ki a vezikulumok feltárására, mely a később alkalmazandó LC/MS analitikát nem zavarja. A módszer fagyasztás-olvasztás ciklusok alkalmazásán alapul, alkalmazásával körülbelül négyszer több fehérjét azonosítottam a vezikulum mintákban, mint az irodalomban általánosan alkalmazott gélelektroforézissel. Ezt követően egy miniatürizált emésztési protokollt dolgoztam ki. A protokoll alkalmas kis összfehérje mennyiségű minta kis térfogatban történő emésztésére továbbá különböző komplex biológiai minták minor fehérje komponenseinek hatékony azonosítására is [2]. A protokoll könnyen kivitelezhető, továbbá nem igényel különleges laborszakozókat. Igazoltam, hogy az általam fejlesztett miniatürizált emésztési protokoll robosztus és jól felhasználható különböző tömegspektrometrián alapuló proteomikai alkalmazásokra. A kidolgozott munkafolyamatot egér thymus eredetű extracelluláris vezikulumok fehérjeinek meghatározására alkalmaztam. Az apoptotikus testekben 142, mikrovezikulumokban pedig 195 fehérjét azonosítottam. Ezen fehérjék között megfigyelhetőek voltak többek között autoantigének és kulcsfontosságú szabályozó és jelzőmolekulák.

## Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **Lilla Turiák**, Petra Misják, Tamás G Szabó, Borbála Aradi, Krisztina Pálóczi, Oliver Ozohanics, László Drahos, Ágnes Kittel, András Falus, Edit I Buzás, Károly Vékey:

Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice.

Journal of Proteomics, 74 (2011) 942-947.

IF: 5.074

2. **Lilla Turiák**, Oliver Ozohanics, Fabio Marino, László Drahos, Károly Vékey:

Digestion protocol for small protein amounts for nano-HPLC-MS(MS) analysis

Journal of Proteomics, 74 (2011) 2025-2033.

IF: 5.074

## Egyéb közlemények jegyzéke

3. Oliver Ozohanics, **Lilla Turiák**, László Drahos, Károly Vékey:

Comparison of glycopeptide/glycoprotein enrichment techniques

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 26 (2012) 215-17.

IF: 2.846

4. Judit Doczi, **Lilla Turiak**, Szilvia Vajda, Miklos Mandi, Beata Töröcsik, Akos A. Gerencser, Gergely Kiss, Csaba Konràd, Vera Adam-Vizi, Christos Chinopoulos:

Complex contribution of cyclophilin D to Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition in brain mitochondria, with relation to the bioenergetic state

Journal of Biological Chemistry, 286 (2011) 6345-6353. IF: 5.328

5. Christos Chinopoulos, Akos A. Gerencser, Miklos Mandi, Katalin Mathe, Beata Töröcsik, Judit Doczi, **Lilla Turiak**, Gergely Kiss, Csaba Konràd, Szilvia Vajda, Viktoria Vereczki, Richard J. Oh, and Vera Adam-Vizi:

Forward operation of adenine nucleotide translocase during F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase reversal: critical role of matrix substrate-level phosphorylation

FASEB Journal, 24 (2010) 2405-2416.

IF: 6.515

## **Köszönetnyilvánítás**

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni mindazoknak, akik segítettek a doktori munkám során.

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Vékey Károlynak, akitől rendkívül sokat tanulhattam, és akihez mindig fordulhattam tanácsért.

Köszönöm Ozohanics Olivernek gyakorlati tanácsait, szakmai észrevételeit, melyek sokat segítettek munkám során.

Őszinte hálámat szeretném kifejezni Dr. Buzás Edit professzor asszonynak, hogy együttműködés keretében a csoportja által izolált extracelluláris vezikulum mintákat tömegspektrometriai vizsgálatra a rendelkezésünkre bocsátotta és munkámat kitüntető figyelemmel kísérte.

Köszönöm a Dr. Buzás Edit professzor asszony által vezetett extracelluláris vezikulum munkacsoport valamennyi tagjának, Misják Petrának, Aradi Borbálának, Pálóczi Krisztinának és Szabó G Tamásnak a vezikulumok preparálásában és az eredmények kiértékelésben végzett munkáját.

Köszönöm Fabio Marinonak az emésztési protokoll reprodukálhatósági vizsgálataiban nyújtott segítségét.

Köszönöm a Tömegspektrometriai Laboratórium valamennyi jelenlegi és volt munkatársának (dr. Drahos László, dr. Ludányi Krisztina, dr. Újszászy Kálmán, dr. Antony Memboeuf, dr. Budai Livia, Gömör Ágnes, Grádné Szabó Rita, Jekő Anita, Tóth Eszter) a segítségét és támogatását.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Christos Chinopoulosnak, TDK témavezetőmnek, aki megismertetett a kutatói munka szépségeivel.

Köszönettel tartozok dr. Szőke Évának a Gyógyszertudományok Doktori Iskola vezetőjének, hogy munkámat a Doktori Iskolában végezhettem.

Köszönöm a GYEMSZI-OGYI valamennyi munkatársának, különösképpen dr. Vankó Évának, Pálos Andreának, dr. Kőszeginé dr. Szalai Hildának és Némethné Palotás Júliának a sok biztatást és lelkesítést.

Szeretnék köszönetet mondani a hozzám legközelebb állóknak, a szüleimnek, öcsémnek és a páromnak a sok türelemért, biztató szavakért, hogy minden körülmények között számíthattam rájuk és hogy biztos háttérrel teremtettek munkámhoz.



