

# Extracelluláris vezikulum fehérjék tömegspektrometriai vizsgálata

Doktori értekezés

**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

# TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK .....	2
I. BEVEZETÉS .....	7
I. 1. Extracelluláris vezikulumok és biológiai jelentőségük .....	7
I. 1. 1. Extracelluláris vezikulum populációk és jellemzőik .....	8
I.1.1.1. Exoszómák .....	9
I.1.1.2. Mikrovezikulumok .....	10
I.1.1.3. Apoptotikus testek .....	11
I. 2. Extracelluláris vezikulumok izolálása, analitikai vizsgálata .....	13
I. 2. 1. Izolálás .....	13
I. 2. 2. Detektálás és méret meghatározás .....	13
I. 2. 3. Vezikulumok mennyiségi meghatározása .....	15
I. 3. A tömegspektrometria szerepe extracelluláris vezikulumok vizsgálatában .....	16
I. 3. 1. Tömegspektrometria .....	17
I. 3. 1. 1. Ionizációs módszerek biomolekulák vizsgálatára .....	18
I. 3. 1. 2. Analízis .....	20
I. 3. 1. 3. „Bottom up” eljárás .....	21
I. 3. 1. 4. „Top down” eljárás .....	24
I. 3. 1. 5. Adatfeldolgozás .....	25
I. 3. 2. Extracelluláris vezikulumok tömegspektrometriai vizsgálata .....	26
I. 3. 2. 1. Feltárással kapcsolatos nehézségek .....	26
I. 3. 2. 2. Kis mennyiségű anyagok emésztésének nehézségei .....	27
I. 3. 2. 3. Extracelluláris vezikulumok vizsgálatának hiányosságai .....	28
I. 3. 2. 4. Thymus (csecsemőmirigy) eredetű extracelluláris vezikulumok vizsgálata .....	29
II. CÉLKITŰZÉSEK .....	30
III. MÓDSZEREK .....	31
III. 1. Anyagok, minták, műszerek, szoftverek .....	31
III. 1. 1. Anyagok .....	31
III. 1. 2. Minták .....	31
III. 1. 3. Műszerek .....	31
III. 1. 4. Szoftverek .....	32
III. 2. A vezikulumok feltárására alkalmazott módszerek .....	32
III. 2. 1. Vezikulumok felbontása felületaktív anyag alkalmazásával .....	32
III. 2. 2. Gélelektroforézis és gélben történő emésztés .....	33

III. 2. 3. Vezikulumok felbontása fagyasztás-olvasztás ciklusok alkalmazásával .	34
III. 3. Fehérje emésztésre használt protokollok.....	35
III. 3. 1. A protokoll [109] .....	35
III. 3. 2. B protokoll [110] .....	36
III. 3. 3. „Mini” protokoll [111].....	36
III. 4. A peptidfragmensek nanoUPLC-MS(MS) analízise .....	38
III. 4. 1. Nanoáramlásos folyadékkromatográfia.....	38
III. 4. 2. Tömegspektrometria.....	39
III. 4. 3. A nanoLC-MS/MS adatok értékelése, a fehérjék azonosítása .....	39
III. 4. 4. „Jelzés nélküli” kvantifikálás .....	41
IV. EREDMÉNYEK .....	42
IV. 1. Az extracelluláris vezikulumok feltárása .....	42
IV. 1. 1. Felületaktív anyagokkal .....	42
IV. 1. 2. Gélelektroforézissel.....	42
IV. 1. 3. Fagyasztás-olvasztás eljárással.....	43
IV. 2. Protokoll kidolgozása kis mennyiségű anyagok emésztésére .....	44
IV. 2. 1. A kidolgozott protokoll reprodukálhatósága, robosztussága .....	44
IV. 2. 2. A kidolgozott protokoll jellemzésére használt mérőszámok, irodalmi adatokkal történő összevetése.....	46
IV. 2. 3. A „Mini” protokoll alkalmazhatósága kis mintamennyiség esetén.....	48
IV. 3. Thymocytá-eredetű mikrovezikulumok és apoptotikus testek proteomikai jellemzése .....	51
IV. 3. 1. A kromatográfiás paraméterek optimalálása.....	51
IV. 3. 2. Azonosított fehérjék .....	52
IV. 3. 3. Biológiai és technikai reprodukálás .....	60
V. MEGBESZÉLÉS .....	63
V. 1. Extracelluláris vezikulumok feltárása.....	63
V. 1. 1. Az egyes feltárási módszerek előnyei, hátrányai.....	64
V. 2. „Mini” protokoll kis mennyiségű fehérje keverékek emésztésére .....	65
V. 2. 1. Kis térfogatban történő emésztés nehézségei .....	65
V. 2. 2. Választott minta .....	66
V. 2. 3. Reagens mennyiségének optimalálása.....	67
V. 2. 4. Nagy tripszin : fehérje arány hatásai .....	67
V. 3. Thymus eredetű mikrovezikulumokban és apoptotikus testekben azonosított fehérjék jelentősége .....	69
V. 3. 1. A preparátum lehetséges szennyezései.....	69

V. 3. 2 Azonosított fehérjék jelentősége.....	70
VI. KÖVETKEZTETÉSEK .....	72
VII. ÖSSZEFOGLALÁS .....	74
VIII. SUMMARY.....	75
IX. IRODALOMJEGYZÉK.....	76
X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....	89
X. 1. Az értekezés témájában megjelent közlemények .....	89
X. 2. Egyéb közlemények jegyzéke.....	89
XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	90

## Rövidítések jegyzéke

<b>Rövidítés</b>	<b>Név</b>
ACN	acetonitril
BLG	béta-laktoglobulin
CD	differenciálódási antigének rendszere
CE	kapilláris elektroforézis
CID	ütközés által kiváltott disszociáció
Da	dalton
DTT	1,4-ditio-treitol
ECD	elektron befogás indukálta disszociáció
EF2	elongációs faktor EF-2
EGFR2	epidermális növekedési faktor receptor 2
EGFRvIII	epidermális növekedési faktor receptor vIII
ESI	elektrospray ionizáció
ETD	elektron-transzfer disszociáció
FA	hangyasav
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GP100	gp100 antigén
HPLC	nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
IL1b	interleukin-1 béta
LAMP1	lizoszóma-asszociált membrán protein 1
LCK	limfocita specifikus protein tirozin kináz
MALDI	mátrix segített lézer deszorpció/ionizáció
MART1	T-sejtek által felismert melanomaantigén
MFGE8	“milk fat globule-epidermal growth factor 8”
MHC	hisztokompatibilitási komplex
miRNS	mikro-RNS
mRNS	hírvivő RNS
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
MS	tömegspektrometria
MTEC	medulláris thymus epithel sejtek

NTA	„nanoparticle tracking analysis”
PGK1	foszfo-glicerát kináz 1
PIGR	polimer immunglobulin receptor
PKM2	piruvát kináz 2
PS	foszfatidilszerin
Q	kvadрупól analízátor
QQQ	hármás kvadрупól analízátor
QTOF	kvadрупól és repülési idő analízátor
Qtrap	kvadрупól és ioncsapda analízátor
Rab	“ras-associated binding”
RAC1	“ras-related C3 botulinum toxin substrate 1”
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SLE	szisztémás lupus erythematosus
TCR	T-sejt receptor
TEM	transzmissziós elektronmikroszkópia
TOF	repülési idő analízátor
TSG101	“tumor susceptibility gene 101”
UPLC	ultranagy hatékonyságú folyadékkromatográfia

# I. BEVEZETÉS

## I. 1. Extracelluláris vezikulumok és biológiai jelentőségük

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. Ilyen esetben a hatás kialakulásának feltétele, hogy a célsejt rendelkezzen az adott molekulára specifikus receptorral. A receptor-ligandum kapcsolódása jelátviteli folyamatot indít, melynek eredménye a sejt működésének valamilyen változása. A kémiai jelátvitel alapján megkülönböztetünk autokrin, parakrin, endokrin és neurokrin kommunikációt [1]. Autokrin jelátvitel esetén a sejt által szekretált hírvivő magán a kibocsátó sejten található receptorhoz kötődik. Parakrin jelátvitelről beszélünk, ha a hírvivő a környező sejteken található receptorához kötődik. Endokrin kommunikáció alatt a hormonális jelátvitelt értjük, amikor a receptorok távoli sejteken találhatóak, neurokrin kommunikáció alatt pedig a klasszikus, elsősorban idegsejtekre jellemző neurotranszmissziót.

A közelmúltban 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. Ezek a vezikulumok specifikus sejtfelszíni elemekhez kapcsolódva képesek átadni a bennük szállított molekulákat a fogadó sejtnak [2]. Az extracelluláris vezikulumok [3] 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. Receptorkötődést követően intracelluláris jelátvitel indukálására képesek, vagy akár új tulajdonságok megjelenését (pl. metasztázisra való hajlam) idézhetik elő a vezikulumból származó receptorok, enzimek vagy genetikai anyag átadását követően [2]. Mivel a különféle molekuláris alkotók egyidejűleg hatnak a célsejtekre, komplexebb, gyorsabb és hatékonyabb működésváltozást (hatást) válthatnak ki, mint, ami a klasszikus receptor-ligandum kölcsönhatás esetén elérhető lenne.

A szekretált extracelluláris vezikulumoknak különböző szerkezeti és biokémiai tulajdonságokkal rendelkező csoportjai különíthetők el intracelluláris eredetük alapján. Ennek megfelelően ezek a vezikulumok eltérő módon befolyásolják a környező vagy a távolabbi sejtek működését. A különböző szövetekben a sejtek állapotától függően egyidejűleg többféle eredetű és méretű vezikulum populáció is jelen lehet, melyek összetétele időben és térben változik [3]. Extracelluláris vezikulumokat apoptotikus sejtek is kibocsátanak [4], így a pusztuló sejteket is tartalmazó sejt kultúrákat szennyezhetik az apoptotikus sejt eredetű vezikulumok, melyek az élő sejtől származó vezikulumoktól eltérő összetételűek és tulajdonságúak.

A vezikulumok rendkívüli jelentőségét mutatja 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 daganatos betegek testfolyadékából vagy vérplazmájából izolált vezikulumokban egyedi, az adott daganatra jellemző fontos molekulák (biomarkerek) találhatóak és nyerhetők ki [5]. Ilyen molekulák közé tartoznak bizonyos effektor fehérjék (szöveti faktorok), onkoproteinek (pl. EGFRvIII) és miRNS-ek. [6-8]. A közelmúltban az extracelluláris vezikulumok új terápiás szerekként történő alkalmazásáról is beszámoltak daganatos megbetegedések esetén [9-11], kihasználva, hogy a vezikulumok felszínén jelenlévő antigén(ek) immunválaszt indukálnak, ami a daganatos sejteket is elpusztítja. Az I. fázisú klinikai vizsgálatok ígéretesnek bizonyultak. Egy másik jelentős alkalmazási terület lehet a vezikulumok vektorokként történő felhasználása génterápia során [12].

### **I. 1. 1. Extracelluláris vezikulum populációk és jellemzőik**

A különféle méretű és eredetű vezikulum populációk terminológiája az irodalomban nem egységes. Jelen esetben a Théry által javasolt nevezéktant használok [2], azzal a különbséggel, hogy az összes sejt-eredetű vezikulum gyűjtőneveként az extracelluláris vezikulum kifejezést [3] használok, a membrán vezikulum kifejezés szinonimájaként. Képződésük szerint két fő csoportot különböztetünk meg; a mikrovezikulumokat (átmérő 100-1000 nm), melyek a plazmamembránról lefűződéssel keletkeznek, illetve a multivezikuláris testekből exocitózis hatására felszabaduló exoszómákat (átmérő 30-100 nm). Ez a két populáció a leginkább vizsgált és jellemzett



vezikulumok közé tartozik. A nagy átmérővel rendelkező apoptotikus testek (átmérő 1-5 µm) pedig az apoptózis alatt álló sejtekből szabadulnak fel. Meglepő módon a mikrovezikulumokkal hasonló elven képződő apoptotikus testek [13] sokszor kívül esnek az extracelluláris vezikulumok vizsgálatának látókörén.

Az extracelluláris vezikulumok egyéb csoportjait képezik az exoszóma-szerű vezikulumok, valamint a membránpartikulák [2]. Az exoszóma-szerű vezikulumok [14] eredete azonos az exoszómákéval, azonban nem tartalmaznak bizonyos, exoszómákra jellemző lipid komponenseket és méretük, valamint szedimentációs tulajdonságaik szintén eltérnek az exoszómáétól. A membránpartikulák [15] plazmamembránból származó kisebb, 50-80 nm átmérőjű vezikulumok. A három legfontosabb extracelluláris vezikulum populáció (exoszóma, mikrovezikulum és apoptotikus test) a következőképpen jellemezhető:

#### **I.1.1.1. Exoszómák**

Az exoszómákkal kapcsolatos kutatások az 1980-as évek elején kerültek középpontba. Az exoszóma elnevezést elsőként 1981-ben Trams használta [16], aki az exoszómákat sejtekről leváló vezikulumokként jellemezte, melyek a gazdasejtre jellemző enzimaktivitással rendelkeznek. Ezt követően a transferrin receptor vizsgálata során Harding és Stahl számolt be patkány retikulocitákból képződő kicsi vezikulumok létezéséről [17], majd Pan és munkatársai igazolták elektronmikroszkóppal az exocitózissal keletkező, körülbelül 50 nm nagyságú vezikulumok létezését [18].

A foszfolipid kettős réteggel határolt exoszómák mérete (30-100 nm átmérő) a vírusok mérettartományába esik. Az exoszómák endoszomális eredetűek, multivezikuláris testek exocitózisa során keletkeznek konstitutívan vagy indukálás hatására [2]. A multivezikuláris testek az endolizoszomális transzport fontos köztes állomásai, több korai endoszóma fúziójakor képződnek.

Míg eleinte elsősorban immun (dendritikus sejt [13, 19], T-sejt [20], B-sejt [21, 22] és makrofág [19]), valamint tumor sejt eredetű [23, 24] exoszómákat jellemeztek, jelenleg egyre több publikáció számol be különböző testnedvekből (pl. vér [25], vizelet [26], szinoviális folyadék [27], anyatej [28] stb.) izolált exoszómák vizsgálatáról is [29].

Külső felszínükön foszfatidilszerint (PS) [30] és számos fehérjét, pl. CD63, CD81, CD9 és TSG101 hordozhatnak [31]. A különböző sejttípusokból és

testnedvekből származó exoszómák fehérjéit széles körben vizsgálják tömegspektrometria, Western blot, áramlási citometria és immun elektronmikroszkópia segítségével. A különböző eredetű exoszómák fehérjéinek nagy része azonos. Az általánosan előforduló fehérjecsaládok közé tartoznak a Rab családba tartozó GTP-ázok, az annexinek, a tetraspaninok és a hősokk fehérjék [31]. Egyéb, exoszómákban gyakran azonosított fehérjék közé tartoznak metabolikus enzimek (GAPDH, enoláz1, aldoláz1, PKM2, PGK1), riboszomális fehérjék, transzmembrán fehérjék (PIGR, LAMP1 és CD59), jelátvivők (syntenin, 14-3-3, G fehérjék, RAC1), adhéziós fehérjék (MFGE8 és integrinek), ATP-ázok, citoskeletális molekulák (aktinok, tubulinok, kofilin1, ezrin, profilin1, moezin, radixin, miozin, keratinok, gelsolin, fibronektin1) és ubiquitin molekulák (ubiquitin B és C) [31].

Sokrétű biológiai funkcióik közé tartozik az antigén prezentálás, immunmoduláló hatás, sejt-sejt kommunikáció és feltételezhetően fertőző ágensek (prionok [32] és retrovírusok [33, 34]) szállítása és terjesztése. Tumor-eredetű exoszómákban található gyakori antigének a donor sejt felszínének transzmembrán fehérjéi (pl. a különböző rákos megbetegedésekben előforduló humán EGFR2 és karcinoembrionális antigén) vagy a donor sejt endoszomális kompartmentjének fehérjéi, pl. MART1, gp100, stb. [2]. Ezen antigének mellett a szekretált vezikulumok peptid-MHC komplexeket is hordoznak külső felszínükön, melyeket közvetlenül prezentálhatnak a T-sejteknek.

### **I.1.1.2. Mikrovezikulumok**

A mikrovezikulumokat elsőként 1946-ban Chargaff és West jellemezte a vérlémezke-mentes plazma kicsapható alkotójaként, mely képes trombit termelni [35]. Két évtizeddel később, 1967-ben Peter Wolf a friss vérplazmából ultracentrifugálással elválasztott lipid-gazdag frakcióként karakterizálta [36]. A mikrovezikulumok átmérője 100-1000 nm tartományba esik [2], a vérplazmában lévőké 100-400 nm [37]. Méretük átfed a baktériumok és az oldhatatlan immunkomplexek méretével [3]. A plazmamembránról történő lefűződés során szabályozott körülmények között keletkeznek. A tumor sejtektől eltekintve, melyek folyamatosan bocsátanak ki mikrovezikulumokat [38], a vezikulum lefűződésének üteme általánosan lassú [39]. A mikrovezikulumok szabályozott felszabadulása hatékonyan indukálható bizonyos

sejtfelszíni receptorok aktiválásával, melyek intracelluláris kalciumszint emelkedést [2] és ezáltal plazmamembrán átrendeződést váltanak ki.

Elsődlegesen vérlemezkék, vörösvérsejtek és endoteliális sejtek származékaiként jellemezték őket [3]. A mikrovezikulumok legfontosabb funkciói a következők: prokoaguláns aktivitás [40], IL1b szekréció [41], részt vesznek a rheumatoid arthritis patogenezisében [42], hozzájárulnak a tumorok proinvasív jellegéhez [43], sejten belüli onkogén átalakulást indukálnak [44], részt vesznek a fetomaternalis kommunikációban [45]. PS-t expresszálnak felszínükön, habár beszámoltak PS externalizáció nélküli mikrovezikulumok létezéséről is [46].

Analitikai meghatározásuk általában áramlási citometria és antigén-antitest reakció alapján történik [47].

### **I.1.1.3. Apoptotikus testek**

Az apoptotikus test elnevezés Kerrtől származik [48]. Az apoptotikus testek apoptózis alatt álló sejtekből szabadulnak fel, 1-5  $\mu\text{m}$  közötti átmérőjűek, mérettartományuk a vérlemezkékével körülbelül megegyezik [49]. Jellemző rájuk a PS externalizációja és tartalmazhatnak DNS fragmenseket [50]. Fontos szerepet játszanak többek között onkogének [51] és DNS [52] horizontális szállításában, valamint a B sejtes autoantigének bemutatásában [53]. Kimutatták, hogy az apoptotikus testek felvétele a makrofágokba immunszuppresszióhoz vezet [54]. Izolálásuk helyett a legtöbb vizsgálatban apoptózis alatt álló sejtek ko-kultúráit használják ezen struktúrák funkcióinak vizsgálatához, szerepük megértéséhez.

Az 1. táblázatban a három extracelluláris vezikulum populáció néhány jellemző tulajdonságát foglaltam össze

1. táblázat A három extracelluláris vezikulum populáció főbb jellemzőinek összefoglalása

	Exoszóma	Mikrovezikulum	Apoptotikus test
Méret	30-100 nm	100-1000 nm	1-5 µm
Hasonló méretű struktúrák	vírusok	baktériumok, fehérje aggregátumok	vérlemezekék
Markerek	Annexin-V kötés, CD63, CD81, CD9, LAMP1 és TSG101	Annexin-V kötés, integrinek, szelektinek, szöveti faktorok, sejt-specifikus fehérjék	Annexin-V kötés, DNS, hisztonok
Eredet	multivezikuláris test	plazmamembrán	apoptózis alatt álló sejtek
Izolálás	centrifugálás és szacharóz grádiensen történő ultracentrifugálás (100 000 - 200 000 g)	centrifugálás (18 000 - 20 000 g)	nincsen általános protokoll az izolálásra
Vizsgálómódszerek	Western blot, TEM, áramlási citometria, MS	áramlási citometria, antigén-antitest reakció, MS	áramlási citometria

## **I. 2. Extracelluláris vezikulumok izolálása, analitikai vizsgálata**

Tekintettel a vezikulum populációk kis méretére, a vizsgálatukra használható analitikai eszközök meglehetősen korlátozottak. Az analitikai tényezők standardizálására az utóbbi időben egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek [47, 55]. A következőkben összefoglalom a vezikulumok izolálásával kapcsolatos nehézségeket, valamint az azonosításukhoz és mennyiségi meghatározásukhoz használatos analitikai módszereket.

### **I. 2. 1. Izolálás**

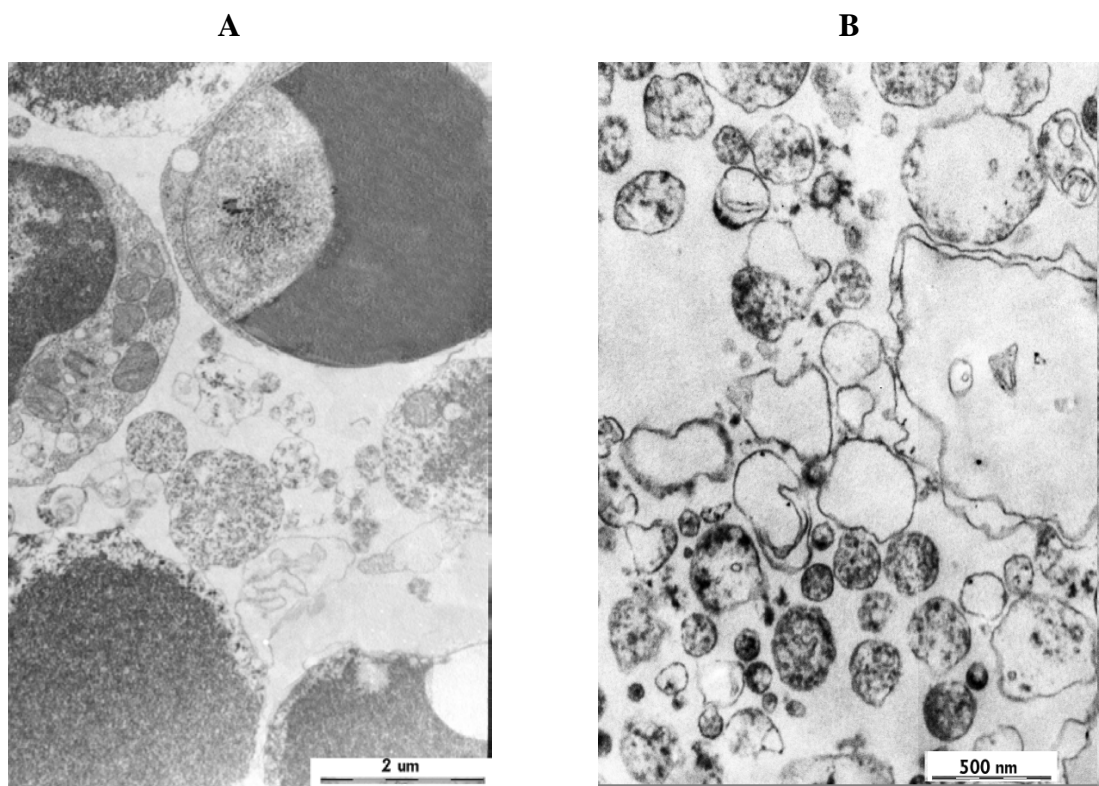
Annak ellenére, hogy a különböző vezikulum populációk izolálása hasonló elven történik, széles körben elfogadott standard protokoll csak az exoszómák izolálása esetén áll rendelkezésre. Kinyerésük (izolálásuk) szacharóz grádiensen történő ultracentrifugálás (100 000-200 000 g) segítségével lehetséges [56]. Az exoszómák sűrűsége 1,13–1,19 g/ml [2].

A mikrovezikulumok és apoptotikus testek izolálására nem áll rendelkezésre standard protokoll. Az előbbieket esetében általánosan 18 000 g (30 perc) – 100 000 g (60 perc) centrifugálást alkalmaznak [57]. Az izolálást nehezíti a biológiai mintákban és sejt felülszókban a többféle, méretben átfedő vezikulum populáció egyidejű jelenléte. További nehézséget jelenthet a differenciál-centrifugálás során bizonyos populációk szelektív elvesztése is [58]. Ezen problémákra nyújthat megoldást az extracelluláris vezikulumok immunaffinitáson alapuló izolálása [59].

### **I. 2. 2. Detektálás és méret meghatározás**

A vezikulum populációk kis mérete miatt viszonylag kevés módszer áll rendelkezésre detektálásukhoz. Méretük meghatározása elsődlegesen transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) lehetséges. A felvétel elkészítéséhez szükséges a vezikulumok izolálást követő koncentráció centrifugálással, majd dehidratálása és rögzítése. Ezek a lépések azonban befolyásolhatják/megváltoztathatják a vezikulumok méretét és morfológiáját [3].

*Dale* és munkatársai konfokális lézer mikroszkóppal jellemezték vérlemezke eredetű mikropartikulákat [60]. A detektálás előtt a mikropartikulákat fluoreszcensen jelzett antitestekkel jelölték. A kapott eredményt befolyásolhatja azonban az antitest specificitása és affinitása a cél antigénhez, valamint az antigén mennyisége a mikropartikula felszínén. Az említett hátrányok ellenére a transzmissziós elektronmikroszkópia és a fluoreszcens konfokális lézer mikroszkópia az egyedüli módszerek melyekkel egyidejűleg lehet vizsgálni a vezikulumok eredetét, méretét és szerkezetét.



**1. ábra Thymus vezikulumokból izolált apoptotikus testek (A) és mikrovezikulumok (B) elektronmikroszkópos felvétele [61]**

A vezikulumok méretének meghatározására használható a fentiekén kívül a dinamikus fényszórás mérés is. A módszer a megvilágított részecskék által szórt fény vizsgálatán alapul, melyből a részecskék tulajdonságaira lehet következtetni. A technika hátránya, hogy elsősorban monodiszperz részecskék vizsgálatára használható, míg a sejt-eredetű vezikulumok többsége polidiszperz. Emiatt a dinamikus fényszórással becsült vezikula méreteloszlás hibával terhelt, hiszen a kis mennyiségben jelenlévő

nagyméretű vezikulumok vagy szennyezők jobban szórják a fényt a kisméretű vezikulumoknál.

A dinamikus fényszóráshoz hasonló módszer a „nanoparticle tracking analysis” (NTA). A módszer folyadékban jelenlevő részecskék vizsgálatára alkalmas, mozgásukból következtet méretükre. A módszer óriási előnye, hogy fluoreszcens üzemmódban alkalmas 50 és 1000 nm közötti polidiszperz részecskék vizsgálatára [62]. A kapott eredmények pedig jól egyeznek a transzmissziós elektronmikroszkóppal készített felvételekével [62].

A vezikulumok felületén található anyagok vizsgálatára atomerő-mikroszkóp használatos. Az atomerő-mikroszkóp működése a felületet pásztázó tű végén elhelyezett egyetlen, legtöbbször CO molekula és a felület atomjai között fellépő taszító erő mérésén alapul. Nemrégiben *Yuana* és munkatársai [63] igazolták, hogy az atomerő-mikroszkóp érzékenyen képes azonosítani a mikropartikulák bizonyos alcsoportjait az áramlási citometria által mérhető mérettartományánál jóval kisebb, nano-tartományban is. Az atomerő-mikroszkópot vételezve eredetű mikropartikulák képződésének nyomon követésére is felhasználták már [64].

A Western blot eljárást gyakran alkalmazzák vezikulumokban található fehérjék kimutatására. A tömegspektrometrián alapuló fehérje azonosítás elterjedése óta azonban főként a tömegspektrometriai adatok validálására használatos.

### **I. 2. 3. Vezikulumok mennyiségi meghatározása**

A vezikulumok mennyiségi meghatározására elsődlegesen az áramlási citometriát használják. A vezikulumok egy lézer előtt haladnak el a minta áramlása során. A kiértékelés a vezikulumok fényszórásán alapul. A módszer előnyei közé tartozik gyorsasága és hogy lehetőséget ad a vezikulumok eredetének és mennyiségének meghatározására is. Hátránya, hogy csak a 200 nm-nél nagyobb méretű vezikulumok detektálására képes, így az exoszómák és kisebb méretű vezikulumok a módszerrel közvetlenül nem vizsgálhatóak. Az extracelluláris vezikulumok áramlási citometrián alapuló meghatározásának standardizálása terén az elmúlt időben óriási előrelépések történtek [65, 66]. A vezikulumok abszolút számának, illetve koncentrációjának meghatározásához ismert koncentrációjú gyöngyökkel végzett kalibrációt alkalmaznak. A mikrovezikulum populáció meghatározásához 1 µm átmérőjű gyöngyöket

használnak, melyek a felső mérethatárt jelölik. A vezikulumok eredetének meghatározása fluoreszcensen jelölt antitestek hozzáadásával lehetséges. Habár nem minden mikrovezikulum expresszál PS-t a külső felszínén [46, 67], a mikrovezikulumok teljes mennyiségének meghatározására fluoreszcens festékekkel jelölt annexin V antitestet alkalmaznak. Az annexin V PS-hez való kötődését azonban befolyásolja a kalcium koncentráció, valamint a membrán PS tartalma [46]. A mennyiségi meghatározásban további problémát jelenthet a mikrovezikulumokkal méretben átfedő oldhatatlan immunkomplexek jelenléte, melyekről kimutatták, hogy szintén jelet adnak az áramlási citométerben [37].

A mikrovezikulumok és fehérjekomplexek által adott jelek kis koncentrációjú detergens hozzáadásával elkülöníthetőek, hiszen ezek a vezikulumok lízisét okozzák, viszont az immunkomplexeket és fehérjeaggregátumokat nem bontják szét [37]. A detergens optimális koncentrációját minden esetben titrálni kell.

A vezikulumok alcsoportjainak mennyiségi meghatározása történhet antigén-antitest reakció alapján is. Az antitesttel reakcióba lépő vezikulumok másodlagos antitest segítségével [68] vagy valamilyen egyéb tulajdonságuk alapján, pl. prokoaguláns aktivitás [69] jellemezhetőek illetve kvantifikálhatóak. A módszer előnye pl., hogy közvetlenül lehetséges a mikrovezikulumok vérből történő meghatározása, míg hátránya a korlátozott tapasztalat, illetve a kötődés kinetikájával kapcsolatos kérdések tisztázatlansága.

A vezikulumok fehérje összetételéről a legrészletesebb információt a tömegspektrometriai vizsgálatok nyújtják.

### **I. 3. A tömegspektrometria szerepe extracelluláris vezikulumok vizsgálatában**

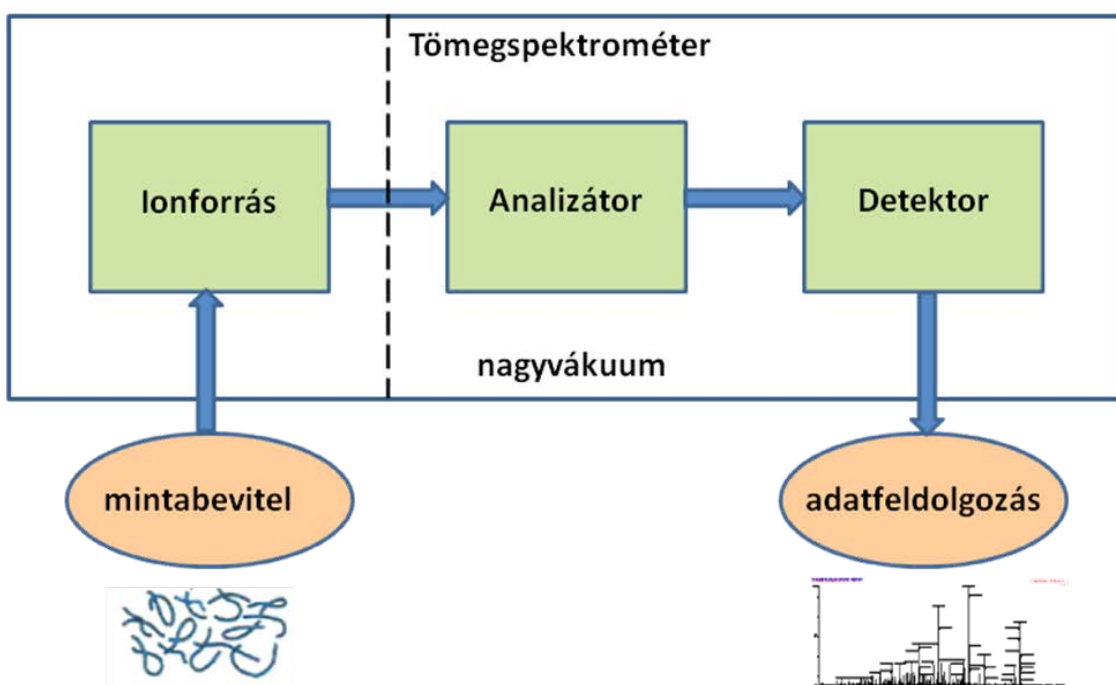
A vezikulumokban található fehérjék azonosítására elsősorban a tömegspektrometriai módszereket alkalmazzák, kihasználva a technika kitűnő érzékenységét és felbontóképességét. Ehhez azonban szükséges a fehérjék extrakciójának és a kis anyagmennyiségekkel kapcsolatos egyéb problémáknak a megoldása. A tömegspektrometriához szervesen csatlakoznak a mintaelválasztó



módszerek (pl. HPLC és elektroforézis), ezeket a technikákat néhány szóban szintén ismertetem.

### I. 3. 1. Tömegspektrometria

A tömegspektrometria a vegyületek molekulatömegének meghatározásán alapuló nagy hatékonyságú analitikai eljárás, melynek feltétele a molekulák ionizációja. A tömegspektrométer a következő részekből áll: ionforrás, analizátor – itt történik a képződött ionok tömeg/töltés ( $m/z$ ) szerinti elválasztása – és a detektor (2. ábra).



2. ábra A tömegspektrometriás vizsgálat folyamata (Az ábra saját készítésű a <http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm> internetes oldal felhasználásával)

A tömegspektrométerrel készített felvételen, a tömegspektrumban a vizsgált mintamolekula intenzitása szerepel tömeg/töltés arányának függvényében. A módszer óriási előnyei közé sorolhatók nagy érzékenysége ( $10^{-15}$  mol anyag egyszerűen vizsgálható), a rövid analízisidők, valamint kromatográfiás rendszerekhez való kapcsolhatósága, mely bonyolult keverékek vizsgálatát is lehetővé teszi. Hátrányaiként

említhető, hogy a felvett spektrumok kiértékelése bonyolult lehet, valamint az izomerek megkülönböztetése nehézségekbe ütközhet előzetes kromatográfiás elválasztás vagy minta-előkészítési lépések alkalmazása nélkül.

Az eltérő elveken működő ionforrások rendkívül sokféle anyag (atomok, molekulák, fehérjék, polimerek, komplexek stb.) vizsgálatát teszik lehetővé. A pontos tömeg meghatározásán kívül a tömegspektrométer jelentős szerkezetvizsgáló módszer is. A tandem tömegspektrometria segítségével nyomon követhető valamilyen kiválasztott molekula fragmentációja, így fontos információt nyerhetünk a vizsgált anyagunkról. Ez különösen fehérjék meghatározásakor fontos, hiszen a tandem tömegspektrometria segítségével lehetséges a peptidszekvencia meghatározása. A rutin analitikában elsősorban szennyezések kimutatására, illetve metabolitok szerkezetének felderítésére alkalmazzák.

### **I. 3. 1. 1. Ionizációs módszerek biomolekulák vizsgálatára**

A tömegspektrometria előnyei jól kihasználhatóak a proteomikai vizsgálatok során. A proteomika az élő szervezetben előforduló összes fehérje, azaz a proteom megismerésével foglalkozó tudományterület. Célja a fehérjék szerkezetének, biológiai funkciójának és ezek térbeli és időbeli változásának felderítése [70]. Korszerű kémiai analitika eszközök felhasználásával válik lehetővé az igen eltérő mennyiségű fehérjék kimutatása, azonosítása, szerkezetük meghatározása [70]. A proteomikával kapcsolatos vizsgálatokat nagyban elősegítette a tömegspektrometria rohamos fejlődése. Az 1980-as évek végén felfedezett két lágy ionizációs módszer – az elektroporlasztásos ionizáció (ESI), valamint a mátrix segített lézer deszorpció ionizáció (MALDI) – bevezetése tette lehetővé ezen nagy molekulatömegű anyagok analízisét és a proteomika igazi térhódítását. A két ionizációs módszer feltalálóját 2002-ben Nobel-díjjal jutalmazták.

Az óriási biomolekulák vizsgálatára is alkalmas ESI-t 1989-ben Fenn és munkatársai [71] írták le, ami azóta is a proteomikai kutatások egyik leggyakrabban alkalmazott ionizációs technikája. A folyékony halmazállapotban lévő minta egy kapillárison áthaladva jut el az ionforrásig, ahol a nagy feszültség, porlasztógáz és fűtés az ionizációt segítik elő. A kapilláris és a vele szemben elhelyezett ellenelektrod között kialakuló elektrosztatikus tér hatására a kapillárisból kilépő folyadék töltött cseppekre esik szét. Az ESI mechanizmusát kétféle modellel magyarázzák: a töltésmaradvány

modell szerint a képződött többszörösen töltött cseppek a fellépő párolgás következtében egy kritikus méretet elérve a töltés taszítás miatt „szétrobbannak” (Coulomb robbanás). Ennek következtében egyre kisebb méretű cseppek keletkeznek, és végül csak a minta protonált ionjai ( $MH^+$ ) jelentkeznek. Az ion evaporációs modell a többszörösen töltött ionok képződését azzal magyarázza, hogy a töltött aeroszol csepp kisebb oldószer cseppeket lök ki magából, amelynek következtében az összes oldószer elpárolog. Az ESI óriási előnye, hogy kapcsolható kromatográfias rendszerhez. A vizsgálandó minta bejuttatása nem csak közvetlenül direkt injektálással történhet, hanem on-line HPLC-ESI-MS kapcsolással is. Az elválasztás hatékonysága jelentősen növelhető nanoUPLC alkalmazásával [72]. A gyorsabb és hatékonyabb elválasztás érdekében a nanoUPLC a HPLC-nél magasabb nyomáson működik és a töltet szemcsemérete kisebb ( $< 2 \mu m$ ). Az utóbbi időben a nanoUPLC-t általánosan alkalmazzák biológiai minták elválasztására.

Fontos azonban, hogy a kromatográfia során csak illékony pufferek használhatóak (pl. ammónium-formiát, ammónium-karbonát), mivel a rendszer nem tolerálja a sókat és szennyezéseket. Mivel többszörösen töltött molekulaionok is keletkezhetnek, a módszerrel vizsgálható molekulák köre rendkívül széles: nagy molekulatömegű proteinek, glükoproteinek, oligonukleotidok és polimerek analízisét teszi lehetővé. A módszer rendkívül érzékeny,  $10^{-12}$ - $10^{-15}$  mol anyag kimutatása és azonosítása rutinszerű, továbbá mennyiségi meghatározásra is alkalmas. Az ionforrást leggyakrabban kvadrupól (Q)/hármaskvadrupól (QQQ), repülési idő (TOF) ill. ioncsapda (iontrap) analizátorokkal kapcsolják. Manapság egyre gyakrabban alkalmazzák ezek kombinációit is (pl. QTOF, Qtrap stb.).

A proteomikában a másik általánosan használt, szintén nagy molekulatömegű biomolekulák ionizációjára alkalmas módszert, a MALDI-t 1988-ban Tanaka [73] és tőle függetlenül Hillenkamp és mtsai dolgozták ki [74]. A mintát az alkalmazott lézer hullámhosszán erős fényelnyelést mutató molekulával (pl. nikotinsav, fahéjsav stb.) együtt kristályosítják. A mátrix a minta gázfázisú ionizációját segíti elő és minimalizálja a minta bomlását. A lézer besugárzás hatására a kristályos anyag elpárolgása során a minta molekulái szeparáltan lépnek át a gázfázisba. Az ionizáció során elsősorban egyszeres, esetleg kétszeres töltésű ionok, protonált, gyakran kationizált molekulák (pl.  $(M+Na)^+$ ,  $(M+K)^+$ ) keletkeznek és észlelhetőek a spektrumban. Előnyei, hogy nagy

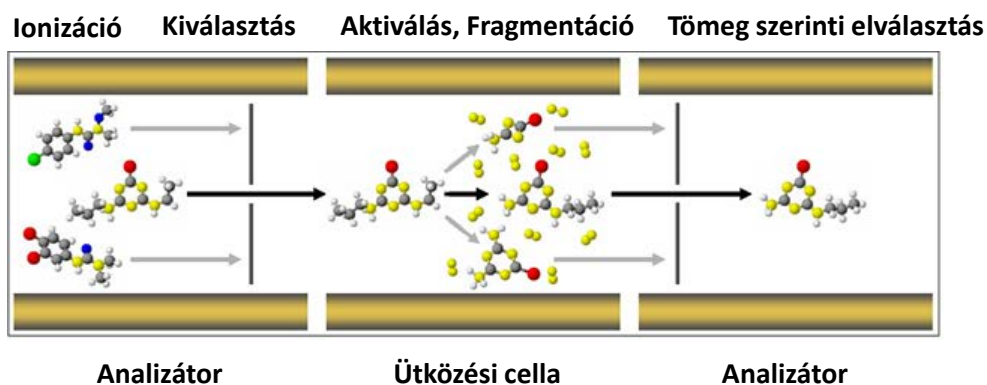
molekulatömegű anyagok vizsgálatára is alkalmas (~3 000 - 200 000 Da), rendkívül érzékeny módszer ( $10^{-15}$ - $10^{-21}$  mol). Az ESI-vel ellentétben toleráns só-szennyezéssel szemben (mmol/l koncentrációban) és alkalmas keverékek közvetlen analízisére. Legfőbb hátrányai, hogy mennyiségi meghatározásra kevésbé alkalmas, on-line nem kapcsolható kromatográfias rendszerhez és, hogy nagy tömegű molekulák esetén a molekulacsúcs széles lehet. A MALDI ionforrást leggyakrabban TOF analízátorral kapcsolják.

### I. 3. 1. 2. Analízis

Az analízátor feladata a képződött ionok tömeg/töltés alapján történő szétválasztása. A Q-TOF készülék két különböző elven működő analízátorral rendelkező tandem tömegspektrométer. Ez a tömegspektrométer egy Q és egy TOF analízátorból áll, a kettő között pedig egy ütközési cella helyezkedik el. Ezáltal lehetséges a proteomikai minták molekuláinak és fragmenseinek analízise is. A készülék kétféle üzemmódban működtethető.

MS-módban a kvadрупól analízátoron majd ütközési cellán áthaladó ionizálódott molekulák a repülési idő analízátorban fókuszálódnak, ahol tömeg/töltés szerint szétválasztódnak.

MS-MS módban (3. ábra) a kvadрупól analízátorral tetszőlegesen kiválasztott ionizálódott molekula jut csak az ütközési cellába, ahol inert gáz (argon) hatására



3. ábra MS/MS mérés elvének szemléltetése (Az ábra saját szerkesztésű a <http://notijenck.com.ar> internetes oldal felhasználásával)

fragmentáció következik be és a képződött fragmensek tömeg /töltés szerint szétválasztódnak a repülési idő analizátorban. Az egyes biomolekulák fragmentációjának előidézéséhez szükséges ütközési energia eltérő, minden esetben optimalizálni kell.

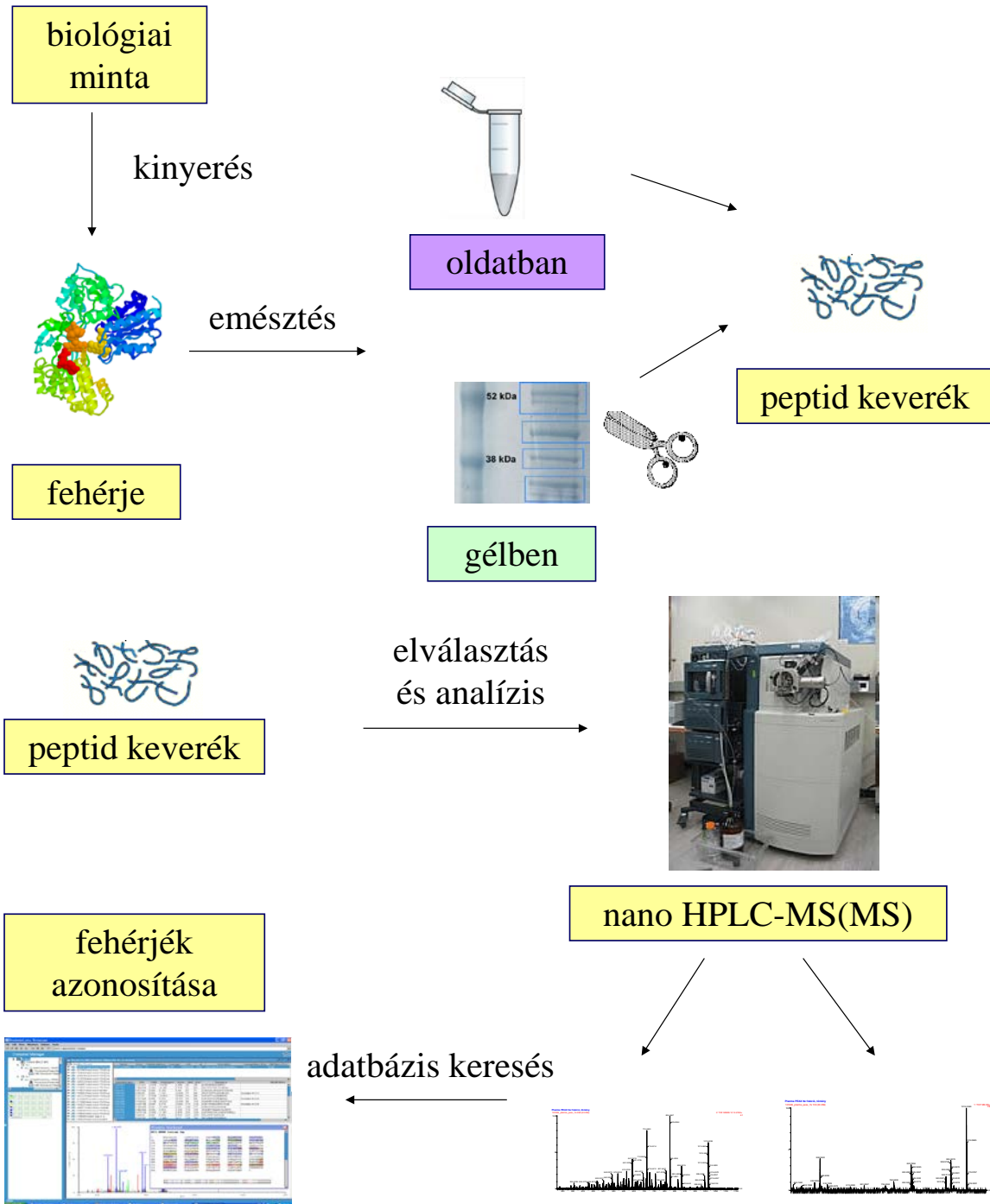
### **I. 3. 1. 3. „Bottom up” eljárás**

A fehérjék tömegspektrometrián alapuló azonosításának két fő irányvonala létezik [75] [76]. A „bottom-up” eljárás alulról felfelé építkezik, azaz a tisztított fehérjék vagy fehérje keverékek proteolitikus hasítását követően a képződött peptidfragmenseket ionizálja és vizsgálja [77]. Ezzel szemben a „top down” eljárás során az intakt fehérjéket vagy óriási fehérje fragmenseket fragmentálják gáz fázisban [77].

A „bottom-up” eljárás során a tömegspektrométerben peptideket vizsgálunk, melyeket egy vagy sok fehérje proteolitikus hasításának („emésztésének”) eredményeként nyerünk (4. ábra). Ebben az esetben azonban az emésztett minta akár több ezer vagy több százezer peptidet is tartalmazhat. Az emésztést megelőzően a komplex minta fehérjéit szétválaszthatjuk elektroforézis vagy kromatográfia segítségével, így csökkentve a minta komplexitását.

Lehetőség van a peptidek emésztést követő elválasztására is. Erre folyadékromatográfiát vagy kapilláris elektroforézist alkalmaznak, melyek on-line kapcsolhatóak ESI ionforrással rendelkező tömegspektrométerhez. A CE-MS technikának számos előnye lehet, így az ideális ionizáció szempontjából kedvező áramlási profil, az olcsó kapillárisok, a nagy felbontás és gyors elválasztás, a kis oldószerfogyasztás, valamint az, hogy alkalmas heterogén minták vizsgálatára is [78]. Ugyanakkor a CE-MS kapcsolat még mindig nem tekinthető robusztus, rutin megoldásnak. Ezért rutin eljárásként manapság a HPLC-MS kapcsolt technikát alkalmazzák. Nagyon nagyszámú peptidfragmenst tartalmazó minta esetében azonban két vagy több dimenziós kromatográfiás elválasztás elvégzésére is szükség lehet a tömegspektrometriai vizsgálat elvégzése előtt.

A „bottom-up” eljárással a fehérjék kétféleképpen azonosíthatóak: „peptide mass fingerprint” vagy tandem MS (MS/MS) módszerrel. A „peptide mass fingerprint”



#### 4. ábra A „bottom up” eljárás folyamatábrája

azonosítás során az MS felvétellel nyert peptidok tömegét hasonlítjuk valamely adatbázisban található fehérjeszekvenciáknak a kísérletünkben használt emésztőenzimnek megfelelő "in silico" hasításával nyert, számolt peptid tömegértékeihez. A módszer fő hátránya, hogy csak tiszta fehérjék és egyszerű

fehérjekeverékek esetén alkalmazható, illetve, ahhoz, hogy egyedileg azonosítsunk egy fehérjét, számos peptidfragszékének azonosítása szükséges. A peptidfragszék azonosítására alkalmas mőszerek a MALDI ionforrással rendelkező repőlési idő tömegspektrométerek és a tandem tömegspektrometriára alkalmas mőszerek. A módszer előnye a nagy áteresztőképesség, azonban a „peptide mass fingerprint”-en alapuló fehérje azonosítást a proteomikában ma már nem fogadják el.

A fehérjék tandem tömegspektrometriai azonosítása során a tömeganalizátorban kiválasztott peptidek izolálhatóak és fragsmentálhatóak. A fragsmionok tömegeiből következtetni lehet a prekursor ion aminosav sorrendjére; ez az alapja az MS/MS-sel történő szekvenálásnak [79], ami azonban rendkívül időigényes eljárás. A fragsmentációs adatok szintén felhasználhatóak az aminosav szekvencia kisebb darabjainak meghatározásához, mely alapján lehetséges a szekvencia adatbázisokban történő keresése [80]. Manapság a tandem tömegspektrométerek sokaságát használják a „bottom up” MS/MS proteomikai vizsgálatokban, gyakran folyadékromatográfiás elválasztással kapcsolva. A fehérjék meghatározására és jellemzésére ez a legáltalánosabban használt módszer. Hátránya viszont, hogy fontos információk elveszhetnek, például a poszt-transzlációs módosulásokkal kapcsolatban. További nehézséget jelent az elnyomási effektus, miszerint a nagy mennyiségben előforduló fehérjék peptidjeinek nagy intenzitásai elnyomják a kis mennyiségű fehérjék peptidjeinek jeleit és ezekről nem készül tandem tömegspektrometriai felvétel.

A „bottom up” eljárást alkalmazók két fő csoportra oszthatóak [81]. Az első csoportba tartozóak egy- vagy kétdimenziós gélelektroforézist követően gélben emésztik az elválasztott fehérjéket és a peptidek kinyerését követően azokat LC-MS-MS-sel, MALDI-TOF-fal vagy CE-MS-sel vizsgálják. Ebben az esetben előny, hogy az emésztett fehérje molekulatömege és izoelektromos pontja is ismert a 2D gélelektroforézis vizsgálatokból. Bizonyos esetekben még a poszt-transzlációs módosulások is meghatározhatóak. Hátrány viszont, hogy a gélelektroforézis, az emésztés és a peptidek kinyerése nagyon időigényes. A nagyméretű hidrofób fehérjék esetén a rossz kinyerés és bizonyos kis mennyiségben előforduló fehérjék elvesztése az elválasztás és emésztés során további hátrányt jelent. A MALDI-TOF, az LC-MS mellett az egyik leggyakrabban alkalmazott megoldás peptidek analízisére. Különösen a proteinek kétdimenziós gélelektroforézis segítségével történő elválasztást követő

vizsgálatára alkalmas. A MALDI technika fő előnye, hogy az analízisidő rövid, különösen az LC-MS-nél elkerülhetetlen hosszú kromatográfiával összevetve. Az LC-MS technika ugyanakkor sokkal alkalmasabb komplex fehérjekeverék vizsgálatára – adott mintából jóval több protein mutatható ki. A MALDI további előnyei a kitűnő érzékenység, szennyezésekre kevésbé érzékeny és apoláros anyagok is jól vizsgálhatók. A MALDI-TOF MS mérések esetén hátrányt jelent viszont a viszonylag gyenge reprodukálhatóság, így kvantitatív vizsgálatokra kevésbé alkalmas.

A másik csoport képviselői többdimenziós kromatográfiát használnak, mellyel az egész folyamat automatizálható és a kis mennyiségű fehérjék azonosítása kevesebb hibával terhelt. Így azonban elvesznek a fehérjével kapcsolatos további információk (tömeg, pI), és csökken az áteresztőképesség a hosszú analízisidők miatt.

#### **I. 3. 1. 4. „Top down” eljárás**

A „top-down” eljárás során a tömegspektrométerben intakt fehérjék ESI ionizációval előállított molekulaionjait vizsgálják, melyeket gázfázisban történő fragmentálással nyernek. A fragmentáció gázfázisú CID (ütközés által kiváltott disszociáció), ECD (elektron befogás indukálta disszociáció) vagy ETD (elektron-transzfer disszociáció) módszerrel történik. CID esetén a fragmentációt semleges ütközési gáz alkalmazásával lehet előidézni. Az ETD a fragmentálandó többszörös pozitív töltéssel rendelkező ion és egy gyökanion elektronbefogásos reakcióján alapul. ECD fragmentáció pedig elektronnaláb alkalmazásával idézhető elő. „Top-down” vizsgálatokra részben a MALDI ionizáció is alkalmas lehet [82]. A MALDI alkalmazásának hátránya, hogy a molekula csak kis mértékben ionizált (főleg egyszeres töltésű ionokat eredményez) ezek fragmentációja pedig sokkal kedvezőtlenebb, mint a sokszor töltött ionok (vagyis az ESI) esetén. Ennek következtében a MALDI inkább csak nagyméretű polipeptidek top-down vizsgálatára alkalmas.

A „top-down” módszer legfőbb előnye, hogy a teljes protein szekvencia vizsgálható, továbbá lehetséges a poszt-transzlációs módosulások közvetlen analízise és elkerülhető a fehérjék időigényes emésztése. Korlátai közé tartoznak a többszörösen töltött fehérjék fragmentációja során keletkező bonyolult spektrumok értelmezése, a „top down” eljáráshoz szükséges drága készülékek, valamint az, hogy a vizsgálható fehérjéknek molekulatömeg korlátja van. A fehérjék molekulatömegének felső határa 50



kDa, e mérethatár felett a módszer nem működik jól. A „top-down” technikával nyert adatok értékeléséhez használt bioinformatikai eszközök is kevésbé fejlettek összehasonlítva a „bottom up” proteomikai vizsgálatokat szolgálókéval.

### **I. 3. 1. 5. Adatfeldolgozás**

A proteomikai mérések során rögzített számtalan tömegspektrum kiértékelésében számítógépes programok segítenek. A tömegspektrumban szereplő tömeg/töltés értékeket adatbázisokban rögzített peptidok és peptidfragmensek elméleti tömegéhez hasonlítják és az így azonosított peptidfragmensekből határozzák meg, hogy a minta milyen fehérjéket tartalmaz. Ezek a különféle proteomikai szoftverek rendkívül meggyorsítják és megkönnyítik a komplex proteomikai minták adatfeldolgozását. A „bottom up” proteomikában leggyakrabban alkalmazott szoftverek a Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com) [83]), a ProteinLynx Global Server (Waters, Milford, MA, USA), a SEQUEST (<http://fields.scripps.edu/sequest>) és a Scaffold (Proteome Software Inc., Portland, OR). Ezen szoftverek különböző algoritmusok szerint osztályozzák a mintában azonosított fehérjéket és egyedi pontrendszerrel rendelkeznek. Az eredmények megadásakor megszabnak egy konfidencia intervallumot és az ezen megbízhatósághoz tartozó ponthatárt. A Mascot program által generált pontszám valószínűség alapú, és számos előnnyel rendelkezik: egyszerűen megállapítható, hogy az eredmény szignifikáns-e, a pontszám összehasonlítható mások kereséseinek eredményével, a keresési paraméterek könnyen optimalizálhatóak [83].

Az irodalomban az MS/MS alapú peptid és fehérje azonosításnak különböző minőségi követelményei szerepelnek. Általában szigorú követelmények használatosak [84]. A Mascot keresőprogram alkalmazása esetén ez azt jelenti, hogy a fehérje azonosítása akkor fogadható el, ha a hozzátartozó ún. „Mascot score” értéke biztos találatnak felel meg ( $p < 0,01$ ) és a fehérje legalább két egyedi peptidfragmense is azonosított [85]. A peptidok közül a 95%-nál ( $p < 0,05$ ) nagyobb valószínűséggel azonosítottakat fogadják el az irodalomban [86]. A fehérje elfogadásához szükséges minimális „Mascot score” értéke adatbázis függő. A tévesen azonosított fehérjék mennyiségének meghatározására fordított szekvencia adatbázisban történő kereséseket használnak [87].

A „top down” vizsgálatok során nyert spektrumok általában nehezebben értelmezhetőek, azonban manapság már egyre több számítógépes program elérhető az intakt fehérjék MS/MS spektrumainak kiértékelésére is.

### **I. 3. 2. Extracelluláris vezikulumok tömegspektrometriai vizsgálata**

Az extracelluláris vezikulumok tömegspektrometrián (tripszines emésztést követő peptidek azonosításán) alapuló első proteomikai vizsgálatáról az 1990-es évek végén számoltak be [88]. Elsőként dendritikus sejtek által szekretált exoszómák fehérje összetételét határozták meg [88], melyet számos hasonló vizsgálat követett különböző eredetű exoszómákon. Egy évtizeddel később egy akadémiai csoport javasolta ezen adatok összegyűjtését [89] és ennek szentelve létrehozta egy adatbázist és weblapot (<http://exocarta.ludwig.edu.au>), mellyel az eredmények könnyebb megismerését szeretnék elősegíteni.

Nemcsak exoszómák, hanem mikrovezikulumok fehérje összetételét is vizsgálták már az irodalomban, elsősorban a vérlemezke eredetűekét [90]. Ezen mikrovezikulumok a vérlemezkékre jellemző membránfehérjékkel rendelkeztek (például Ib, IIb, IIIa, IV, V és IX glikoprotein receptorok), melyek a von Willebrand faktor megkötésére képesek [90]. A IIb-IIIa glikoprotein komplex a vérlemezkéken található legfontosabb fibrinogén receptor, mely fontos szerepet játszik nem csak a vérlemezkék aggregációjában, hanem a mikrovezikulumok képződésében is [91]. A vérlemezke eredetű mikrovezikulumok tartalmaztak még számos véralvadásban fontos fehérjét (pl. fibrinogén, protein S, von Willebrand faktor, stb.), integrineket (pl. CD49b), valamint kemokineket [90]. Számos olyan fehérjét is azonosítottak, melyek a vérlemezkékben nem találhatóak meg (pl. a koleszterin bioszintézisben szerepet játszó foszfomevalonát) [90].

#### **I. 3. 2. 1. Feltárással kapcsolatos nehézségek**

Ahhoz, hogy az extracelluláris vezikulumokban található fehérjéket tömegspektrometriával vizsgálni lehessen, elsőként ki kell nyerni a fehérjéket a vezikulumokból. A vezikulumok felületén található antigének jellemzően nagy molekulásúlyú, hidrofób fehérjék, melyek extrakciója nehézkes [92]. Ezért erre a célra

általánosan ionos/nem ionos felületaktív anyagot (pl. SDS, Triton X-100) vagy magas pH-jú oldószert (nátrium-hidrogénkarbonát pH 11) használnak [92]. Lehetséges továbbá a membránok felbontása fagyasztás-olvasztás ciklusok [93] alkalmazásával is. Ezt követően két lehetőség áll rendelkezésre: a kinyert fehérjék közvetlen emésztése vagy emésztés előtt a fehérjék gélelektroforézissel történő elválasztása. A fehérjék közvetlen tripszines emésztése kedvezőbb lehet, hiszen a munkafolyamatot jelentősen lassítja a gélelektroforézis alkalmazása, továbbá jelentős lehet az információvesztés a gélből nehezen kioldható fehérjék miatt. Az emésztéssel nyert peptidek fordított fázisú folyadékkromatográfiával szétválaszthatóak és ESI ionizációval vizsgálhatóak. A peptidekről készült tandem tömegspektrometriás felvételek alapján a minta fehérjéi azonosíthatóak adatbázisokban történő keresés alapján.

Sajnálatos módon az extracelluláris vezikulumok tömegspektrometriai vizsgálatáról szóló irodalom a vezikulumok feltárásával kapcsolatban igen szűkszavú. A legtöbb esetben a tömegspektrometriai vizsgálatokat megelőzően gélelektroforézist alkalmaznak [29, 90, 94-96], kihasználva, hogy a mintaoldó és futtató pufferekben található felületaktív anyag a vezikulumokat lizálja.

### **I. 3. 2. 2. Kis mennyiségű anyagok emésztésének nehézségei**

A gyakran korlátozott mennyiségben rendelkezésre álló biológiai minták a nanoUPLC-MS alkalmazásának elterjedéséhez vezetett. Ezzel az analízis érzékenységének jelentős növekedése érhető el, azonban mindössze néhány  $\mu\text{L}$  minta injektálható az oszlopra. Éppen ezért nagyon fontos a hagyományos protokollok mellett kisebb mintamennyiségek kezelésére is alkalmas eljárások kidolgozása [97-99]. A tripszinnel történő emésztésre az irodalomban számos protokoll található. Ezek általánosan nagy mennyiségű (mikrogramm) fehérje nagy térfogatban (100-500  $\mu\text{L}$ ) [100-104] történő emésztése esetén ideálisak. Nagy térfogatban történő emésztés esetén a következő lehetőségek közül választhatunk: az emésztett mintának csak egy kis részletét vizsgáljuk, ami jelentős össz-érzékenység csökkenéshez vezet; vagy a mintát bepároljuk, és kis térfogatban visszaoldjuk [98, 104]. Ez utóbbi szintén nem kedvező, hiszen ez egy újabb mintaelőkészítési lépést jelent, továbbá nagy a veszélye, hogy a minta egy részét elveszítjük, mert kitapad az edény falára, valamint az eljárással dúsítjuk a vegyszerekben lévő szennyezéseket is.

A kis térfogatú mintákkal való munka során egy további gyakorlati probléma – különösképp magas hőmérsékleten – az oldószer párolgása. Jellemző, hogy az emésztés során néhány  $\mu\text{L}$  oldószer elpárolog és az edény tetején kicsapódik. Ez a jelenség nem okoz gondot, amikor a minta mennyisége 100  $\mu\text{L}$  feletti, azonban 10  $\mu\text{L}$ -nél kisebb mintamennyiség esetén a vizsgálatot nehezíti (főként a reprodukálás és fehérje azonosítás szempontjából).

A fenti szempontokat figyelembe kell venni a vezikulum minták emésztése során.

### **I. 3. 2. 3. Extracelluláris vezikulumok vizsgálatának hiányosságai**

A extracelluláris vezikulumok proteomikai vizsgálatának fő korlátja, hogy kvantitatív eredményeket eddig nem szolgáltatottak. Így a vezikulumokban azonosított fehérjék mennyisége nem ismert (kivéve, ha utólagosan Western blot vizsgálatot végeznek). Éppen ezért nehéz eldönteni bizonyos kis mennyiségben előforduló fehérjék esetén, hogy az adott fehérje csak egy vezikulum szubpopulációra jellemző vagy esetleg külső szennyező. Példaként említhetőek a nukleáris fehérjék, főként a hisztonok és transzlációs fehérjék (pl. elongációs faktor). Ezen fehérjéket számos vezikulum mintában azonosították már és nem ismert, hogy jelenlétük specifikus-e vagy esetleg a preparátumot szennyező haldokló sejtekből származó szennyezések [30].

A vezikulumokban található fehérjék relatív mennyiségének becslésére felhasználható az úgynevezett „jelzés nélküli” eljárás [101]. Ezt a módszert gyakran alkalmazzák biológiai mintákban megtalálható fehérjék fél-quantitatív becslésére. A „jelzés nélküli” mennyiségi becslésnek két változata létezik. Az egyik módszer azon az elméleten alapul, hogy egy fehérje mennyiségét a fehérje három legintenzívebb peptidjének mennyisége jellemez. Egy adott fehérje három legintenzívebb peptidje jelintenzitásainak átlagát egy ismert mennyiségű belső standard három legintenzívebb peptidje intenzitásának átlagához hasonlítják a HPLC-MS futás során. Mivel a belső standard koncentrációja ismert, lehetővé válik a kvantitatív becslés. A másik módszer, az úgynevezett spektrum számlálási módszer esetén a fél-quantitatív becslés a peptidekről készült spektrumok számából lehetséges.

#### **I. 3. 2. 4. Thymus (csecsemőmirigy) eredetű extracelluláris vezikulumok vizsgálata**

Meglepő módon thymus eredetű extracelluláris vezikulumok proteomikai vizsgálatáról ezidáig nem számoltak még be. 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.

A thymust a többi szövettől két fontos tulajdonsága különbözteti meg. Elsőként a thymocyták rendkívüli apoptózis aránya; becslések szerint a thymusban történő érési folyamatok során a T-limfocita-előalakok körülbelül 95%-a pusztul el apoptózissal [105]. Másik egyedi tulajdonsága a szövet-specifikus antigének sokaságának ektópikus génexpressziója. A thymus-velőállomány epithelsejtjein (MTEC-medullary thymic epithelial cells) több ezer olyan gén fejeződik ki, melyekről korábban úgy gondolták, hogy kizárólag parenchymális szervekre korlátozottak [106]. Mivel becslések szerint a MTEC-ek mennyisége nagyon kicsi, felmerült a sejtek közötti antigén transzfer (például extracelluláris vezikulum átadás) megvalósulásának lehetősége [107]. Ez magyarázatul szolgálna a szövet-specifikus antigének nagyszámú thymus eredetű antigén prezentáló sejthez történő eljuttatására, valamint tovább növelné azon fontos feladatok listáját, melyekben az extracelluláris vezikulumok immunfolyamatokban betöltött szerepéről beszámoltak [2].

Összességében megállapítható, hogy az extracelluláris vezikulumok tömegspektrometriával történő proteomikai vizsgálata egyre fontosabb a vezikulumok funkcióinak megértése szempontjából.

## II. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során az irodalomban eddig kevésbé vizsgált extracelluláris vezikulum típusok: a mikrovezikulumok és apoptotikus testek fehérje összetételének meghatározásával foglalkoztam. Bár az extracelluláris vezikulumok szerepét számos immunfolyamatban igazolták, az egyik fő immunszerv, a thymus által szekretált extracelluláris vezikulumokat még nem karakterizálták.

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 értelemzése.

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.

## **III. MÓDSZEREK**

### **III. 1. Anyagok, minták, műszerek, szoftverek**

#### **III. 1. 1. Anyagok**

A folyadékkromatográfiához alkalmazott eluensek LC/MS-tisztaságúak voltak. A desztillált vizet Milli-Q Ultrapure Water System, Milli gradient készülékkel nyertük (Millipore, Billerica MA, USA). Az emésztéshez az alábbi reageneket alkalmaztam: RapiGest (Waters, Milford, MA, USA), tripszin (Promega, Madison, WI, USA). A gél futtatáshoz szükséges reagenseket az Invitrogen kft-től (Carlsbad, CA, USA); minden egyéb felhasznált reagenst a Sigma-Aldrich kft-től (Steinheim, Németország) szereztünk be.

#### **III. 1. 2. Minták**

A thymus eredetű mikrovezikulum és apoptotikus test minták, valamint a kezdeti módszerfejlesztéshez (vezikulumok feltárása) használt Jurkat T-sejt eredetű extracelluláris vezikulumok a Semmelweis Egyetem Genetikai-, Sejt- és Immunobiológiai Intézettől; a humán plazma minták pedig a Bajcsy-Zsilinszky Kórházból származtak.

A thymus eredetű mikrovezikulum és apoptotikus test minták szerkezetét és méretét együttműködő partnereink TEM-mel igazolták (1. ábra).

#### **III. 1. 3. Műszerek**

A folyadékkromatográfiás vizsgálat előtt a mintákat Table Top Refrigerated Centrifuge Hermle Z300K (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Németország) készüléken centrifugáltam.

Az egydimenziós gélelektroforézist Novex<sup>®</sup> NuPAGE<sup>®</sup> SDS-PAGE Gel System rendszeren (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), előreöntött NuPAGE<sup>®</sup> gélen (Invitrogen Corporation) végeztem.

A folyadékkromatográfiás elválasztást C18 trap oszlopon (180  $\mu\text{m}$  x 20 mm) történő sómentesítést követően 75  $\mu\text{m}$  x 150 mm BEH C18, 1,7  $\mu\text{m}$  nanooszlopon végeztem, nanoAcquity UPLC rendszer alkalmazásával (Waters, Manchester, UK). A tömegspektrometriás vizsgálatok Waters QTOF Premier tömegspektrométeren (Waters, Manchester, UK) történtek.

### **III. 1. 4. Szoftverek**

A kromatogramok és spektrumok felvételéhez és elemzéséhez a MassLynx szoftver 4.1 változatát (Waters, Milford, MA, USA) alkalmaztam. A peptidek azonosításához a ProteinLynx Global Server 2.3 (Waters, Milford, MA, USA) és Mascot Server (www.matrixscience.com) 2.2.7 verziójú szoftvereket használtam. A technikai és biológiai reprodukálások eredményeinek kiértékeléséhez a Scaffold\_3\_00\_03 (www.proteomesoftware.com) programot alkalmaztam.

## **III. 2. A vezikulumok feltárására alkalmazott módszerek**

A vezikulumok membránjának felbontására és a fehérjék kinyerésére három különböző módszert alkalmaztam és hasonlítottam össze. A módszerek a következők voltak.

### **III. 2. 1. Vezikulumok felbontása felületaktív anyag alkalmazásával**

Felületaktív anyagként Triton X-100 (0,2% és 0,5%) és SDS (1%) oldatokat alkalmaztam; melyek jelenlétében a Jurkat T-sejt eredetű vezikulum mintákat 1 óráig szonikáltam. Bepárlást követően a mintát 20  $\mu\text{L}$  vízben visszaoldottam és tripszinnel emésztettem. Emésztést követően koncentrálni céljából a mintát nitrogén áram alatt bepároltam, majd 20  $\mu\text{L}$  0,1% hangyasavat tartalmazó vízben visszaoldottam és a mintát C18-as Zip-Tip (Millipore, Billerica MA, USA) pipettahegygel tisztítottam. A Zip-Tip pipettahegy jól alkalmazható minták koncentrálnására és tisztítására. Alkalmazása a következő lépésekből áll:

- kondicionálás (2 x 10  $\mu\text{L}$  ACN)
- ekvibrálás (3 x 10  $\mu\text{L}$  0,1% hangyasavat tartalmazó Milli-Q víz)



- mintafelvétel
- mosás (10 x 10 µL 0,1% hangyasavat tartalmazó Milli-Q víz)
- megkötődött peptidek leoldása (5 µL 70% ACN 0,1% hangyasav, 30 % Milli-Q víz)

A leoldott peptideket a vizsgálatot megelőzően hatszorosára hígítottam.

### III. 2. 2. Gélelektroforézis és gélben történő emésztés

A második módszer az irodalomban alkalmazott gélelektroforézis és gélben történő emésztés volt. Ezen elválasztástechnika első lépése alkalmas a vezikulumok membránjának feltárására. A Jurkat T-sejt eredetű vezikulumokban található fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását NuPAGE Bis-Tris 12% akrilamid tartalmú gélben (Invitrogen kft.) végeztem. A 15 µL mintához 5 µL NuPAGE LDS 4X (Invitrogen kft.) mintaoldó puffert és 2 µL 500 mM 1,4-ditio-DL-treitol (DTT) adtam. A mintát 15 percig 90 °C-on tartottam, melyet 30 perc szonikálás követett. Ezután ismét 15 percig 90 °C-on tartottam a mintát, majd 3 µL 200 mM jódiacetamidot adtam hozzá és 30 percig szobahőmérsékleten sötétben tároltam, majd 3 percig centrifugáltam 13 500 rpm-en. A molekulásúly markert a következőképpen készítettem elő: 7 µL markert 10 percig 70 °C-on tartottam, majd 5 percig centrifugáltam 13 500 rpm-en. Az elektroforézishez NuPAGE SDS (Invitrogen kft.) puffert használtam.

Az elektroforézis paramétereit:

feszültség (konstans): 200 V

áramerősség (limit): 200 mA

futtatás ideje: 50 perc

A fehérjéket SimplyBlue SafeStain (Invitrogen kft.) festékkel történő festéssel detektáltam, a gyártó szerinti protokollt követve. A fehérje-sávokat kivágtam, mostam, majd felaprítottam kis darabokra. Ezután a gél darabokat sorrendben 50% és 100% acetonitrillel; 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pufferrel, végül 100% acetonitrillel mostam, minden esetben 15 percig, hogy a festéket eltávolítsam a gélből, majd a gél darabokat beszárítottam. A fehérjéket 5 µL 100 mM DTT-vel redukáltam 60 °C-on (30 percig),

majd sötétben 8  $\mu\text{L}$  200 mM jódacetamid hozzáadásával alkiláltam (30 percig). A mintát acetonitrillel és pufferrel történő mosást követően beszárítottam. A teljesen beszáradt géldarabokhoz 20  $\mu\text{L}$  RapiGest 0,2%-os vizes oldatát adtam és a géldarabokat 37 °C-on 10 percig inkubáltam, majd ismét beszárítottam. A géldarabokhoz 3  $\mu\text{L}$  tripszint (0,5 mg/ml) és 47  $\mu\text{L}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  puffert adtam, és a mintákat 45 percig jégen inkubáltam. Ezt követően a minták emésztése egy éjszakán keresztül (16 óra) 37 °C-on ammónium-bikarbonát pufferben történt. Az emésztés leállítását 1% hangyasav (FA) oldattal végeztem.

A peptidek extrakcióját a gélből egy korábban leírt módszer alapján végeztem [108], mely a következő lépésekből állt:

- 1 25  $\mu\text{L}$  5% hangyasav + 50% ACN + 45% Milli-Q víz (20 perc inkubálás)
- 2 centrifugálás 2 percig 13 500 rpm-en, majd az oldat lepipettázása a géldarabról (frakció)  
Az első két lépést háromszor megismételtem és a frakciókat egy Eppendorf csőben egyesítettem.
- 3 Géldarabok beszárítása (30 perc, 50 °C)
- 4 Visszaoldás 30  $\mu\text{L}$  Mill-Q vízben és egyesítés a 2-es pont frakcióival

Az így kapott oldatot C18-as Zip-Tip pipettaheggyel tisztítottam.

### **III. 2. 3. Vezikulumok felbontása fagyasztás-olvasztás ciklusok alkalmazásával**

A harmadik módszer melyet a vezikulumok felbontására használtam, a fagyasztás-olvasztás ciklusok alkalmazása volt. Elsőként a vezikulum mintákat 5 fagyasztás-olvasztás ciklus hatásának tettem ki. Fagyasztási lépésként a mintát egy órán keresztül -20 °C-on tároltam, vagy más esetben a mintákat a ciklusok során fél percig folyékony nitrogénbe mártottam. Egy harmadik esetben pedig a fagyasztás-olvasztás eljárás során 5 ciklus folyékony nitrogént (30 s) és két ciklus -20 °C-on (1 óra) történő fagyasztást alkalmaztam. Az olvasztás minden esetben vízfürdőben szonikálással (10 perc) történt.

A végső módszer, melyet a vezikulumok felbontására alkalmaztam a következő volt: 8  $\mu\text{L}$  felolvasztott 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  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on (1 óra) történő fagyasztást alkalmaztam. A felbontást követően lehetővé vált a vezikulumok fehérje tartalmának emésztése. A 10  $\mu\text{L}$  mintát a III. 3. 3. fejezetben leírt módszerrel emésztettem meg; centrifugálás után a mintákat közvetlenül vizsgáltam, nem koncentráltam őket a nanoLC-MS(MS) vizsgálat előtt.

### **III. 3. Fehérje emésztésre használt protokollok**

A komplex biológiai minták fehérjéinek emésztésére három protokollt alkalmaztam és hasonlítottam össze humán plazma mintán. A plazma számos komponenssel rendelkezik, így felhasználható bonyolult keverékek modellezésére. Ezen protokollok közül kettő irodalmi módszer (A és B protokoll), melyeket módosítás nélkül használtam, egy pedig az új, általam kidolgozott „Mini” protokoll volt. A protokollok összefoglalása a 2. táblázatban található.

#### **III. 3. 1. A protokoll [109]**

60  $\mu\text{L}$  vizsgálati mintát tartalmazó oldathoz (4  $\mu\text{L}$  100 x-ra hígított plazma és 20 pmol BLG oldat vízben) 30  $\mu\text{L}$  0,5 % RapiGest oldatot adtam. A diszulfid csoportok redukálásához szükséges DTT-t valamint az alkiláláshoz szükséges jódiacetamidot 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  oldatban oldottam fel. 5  $\mu\text{L}$  100 mM DTT hozzáadását követően a mintákat  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 30 percig termosztáltam, majd a mintához 12  $\mu\text{L}$  200 mM jódiacetamidot és 38  $\mu\text{L}$  200 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  puffert adtam és a mintákat szobahőmérsékleten 30 percig sötétben tároltam. A fehérjék peptidre hasítását tripszinnel (1:25 tripszin:fehérje arány) végeztem, a mintát  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 90 percig inkubáltam. Az emésztés leállítására és a RapiGest elbontására a mintához 4  $\mu\text{L}$  hangyasavat adtam és  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -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.

### III. 3. 2. B protokoll [110]

12  $\mu\text{L}$  vizsgálati mintát tartalmazó oldathoz (4  $\mu\text{L}$  100 x-ra hígított plazma és 20 pmol BLG oldat vízben) 10  $\mu\text{L}$  0,2 % RapiGest oldatot adtam. A redukáláshoz szükséges DTT-t, valamint az alkiláláshoz szükséges jódacetamidot 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  oldatban oldottam fel. 2  $\mu\text{L}$  100 mM DTT hozzáadását követően a mintákat 60 °C-on 30 percig termosztáltam, majd a mintához 3  $\mu\text{L}$  200 mM jódacetamidot és 30  $\mu\text{L}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  puffert adtam és a mintákat szobahőmérsékleten 30 percig sötétben tároltam. A fehérjék peptidekre hasítását 1:25 arányban (tripszin:fehérje) hozzáadott tripszinnel biztosítottam és a mintát 37 °C-on 90 percig inkubáltam. Az emésztés leállítására és a RapiGest elbontására a mintához 3  $\mu\text{L}$  hangyasavat adtam és 37 °C-on 30 percig inkubáltam. Ezt a minták 10 percig tartó centrifugálása követte 13 500 rpm-en. A minta végtérfogata 61  $\mu\text{L}$ , melyet 150  $\mu\text{L}$ -re egészítettem ki Milli-Q vízzel.

Az emésztést ugyanilyen körülmények között elvégeztem tízed mennyiségű plazmát és belső standardot tartalmazó mintán is. Emésztést követően a mintát Speed Vac készüléken teljesen bepároltam, majd visszaoldottam 15  $\mu\text{L}$  1% FA-at tartalmazó Milli-Q vízben.

### III. 3. 3. „Mini” protokoll [111]

10  $\mu\text{L}$  vizsgálati mintát tartalmazó oldathoz (2  $\mu\text{L}$  500 x-ra hígított plazma és 2 pmol BLG oldat vízben) 1  $\mu\text{L}$  0,13% RapiGest-et és 33 mM DTT-t 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 jódacetamidot 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 arálynak felel meg, mely tízszer nagyobb az A és B protokoll esetében alkalmazott arálynál. Az emésztés leállítására és a RapiGest elbontására a mintához 0,5  $\mu\text{L}$  FA-at 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 edénybe. Az emésztést követően a minta végtérfogata 15  $\mu\text{L}$  volt.

2. táblázat Az alkalmazott emésztési protokollok

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

### III. 4. A peptidfragmensek nanoUPLC-MS(MS) analízise

A proteomikai munkák során nyert triptikus peptidek elválasztása és analízise általánosan nanoLC-MS(MS) módszerrel történik. Elválasztásra elsősorban fordított fázisú C18-as oszlopokat használnak.

#### III. 4. 1. Nanoáramlásos folyadékkromatográfia

A plazmafehérjék illetve az extracelluláris vezikulum peptidjeinek elválasztása a sómentesítést követően fordított fázisú, C18-as kapilláris oszlopon történt NanoAcquity UPLC System kromatográfias rendszer alkalmazásával. Eluensként A) 0,1% hangyasavat tartalmazó HPLC tisztaságú vizet és B) 0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitrilt használtam. A folyadékkromatográfias mérés során alkalmazott grádiensek paraméterei a 3. táblázatban láthatók.

**3a. táblázat A nanoLC gradiens az emésztési protokoll kidolgozása esetén**

Idő (perc)	Áramlási sebesség (μL/perc)	A eluens aránya (%)	B eluens aránya (%)
0	0,4	90	10
70	0,4	50	50
72	0,4	15	85
80	0,4	15	85
82	0,4	90	10
100	0,4	90	10

**3b. táblázat A nanoLC gradiens extracelluláris vezikulumok vizsgálata esetén**

Idő (perc)	Áramlási sebesség (μL/perc)	A eluens aránya (%)	B eluens aránya (%)
0	0,4	90	10
150	0,4	60	40
155	0,4	15	85
180	0,4	15	85
182	0,4	90	10
200	0,4	90	10

A mérések során 2,0-5,0  $\mu\text{L}$  mintamennyiséget injektáltam az oszlopra, ami közvetlenül kapcsolódott a tömegspektrométer nanoESI ionforrásához.

### III. 4. 2. Tömegspektrometria

A fehérjék azonosítása tandem tömegspektrometriával 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 használt grádiens esetén az alapvonalon mért csúcshélesség körülbelül 1 perc, ez 4 mp-es ciklusidő esetén fél-kvantitatív mérésekhez megfelelő. Az MS/MS kísérletek során argon gázt alkalmaztam, az ütközési energiákat pedig a prekursor ion töltési állapota és tömege alapján változtattam a 18-80 eV tartományban. A referenciaoldat 100  $\text{pg}/\mu\text{L}$  leucin-enkefalin oldat volt 1:1 arányú acetonitril:víz elegyben oldva; az oldószer 0,1 % hangyasavat tartalmazott.

A tömegspektrometriai paraméterek

Ionizációs mód: pozitív ionizáció

Kapilláris feszültség: 3,3 kV

Cone feszültség: 30,0 V

Forrás hőmérséklete: 85 °C

### III. 4. 3. A nanoLC-MS/MS adatok értékelése, a fehérjék azonosítása

A kísérlet során nyert spektrumok feldolgozását a ProteinLynx GlobalServer (Waters, Milford, MA, USA) szoftverrel végeztem. A feldolgozott spektrumokat a Mascot (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\_51.6 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 fordított szekvencia adatbázisban történő kereséssel meghatároztam a tévesen azonosított fehérjék mennyiségét;  $p < 0,01$  szignifikancia szintet használva a mikrovezikulumok 0,51%-a, míg az apototikus testek fehérjéinek 0,40%-a volt tévesen azonosított. Az eredmények három független biológiai minta eredményeinek összesítéséből származnak. Az egyik minta esetén három technikai replikátum vizsgálatát is elvégeztem.

A plazmafehérjék azonosítása esetén *Homo sapiens* taxonómiát és a SwissProt\_52 szekvencia adatbázist használtam. A fehérjeazonosítás két kritérium alapján történt. A „szigorú” követelmény esetén legalább két 34-es ( $p < 0,005$ ) „Mascot ion score”-ral rendelkező peptidfragmens azonosítása szükséges. A „laza” követelmény esetén a 24-es pontszámmal ( $p < 0,05$ ) rendelkező fehérjéket is elfogadtuk és egy peptidfragmens azonosítása is elegendő volt. A jelintenzitások meghatározása a kromatográfiás futásokból történt MS üzemmódban. A mennyiségi becslésekre a különböző peptidfragmensek ionkromatogramjainak csúcsterületeit használtam. A kihagyott hasítások és nem specifikus peptidfragmensek azonosítása is Mascot program segítségével történt, az utóbbi esetben szemi-tripszin emésztőenzim beállításával.

A „Mini” emésztési protokoll és az irodalmi protokollok teljesítőképességének jellemzése a következő mérőszámokkal történt: azonosított fehérjék száma és a HPLC-MS kromatogramban észlelt jelintenzitások összehasonlítása. A fehérjék azonosítása a fentebb leírt két kritérium („laza” és „szigorú”) alapján történt. A kiválasztott peptidek csúcsterületeinek meghatározását külön HPLC-MS futásokból végeztem. A „Mini” protokoll reprodukálhatóságát a fenti mérőszámokkal jellemeztem három emésztés esetén (melyet különböző személyek különböző napokon készítettek). A „Mini” protokoll eredményességét két irodalmi protokollal (A és B protokoll [109, 110]) történő összehasonlítást követően állapítottam meg. Az irodalmi protokollok nagyobb mintamennyiségek nagy térfogatú emésztésére alkalmasak, így alkalmazásuk esetén a „Mini” protokollhoz képest tízszeres anyagmennyiséget emésztettem tízszer nagyobb



térfogatban. Ellenőriztem továbbá az egyik irodalmi protokoll esetén a bepárlási lépés reprodukálhatóságra és fehérjék azonosítására gyakorolt hatását is. A „Mini” protokollban bevezettem tetszőleges, kismértékű változtatásokat is, hogy megfigyeljem, azok milyen mértékben befolyásolják a kapott eredményt. Végül ellenőriztem a protokoll alkalmazhatóságát rendkívül kis mennyiségű fehérje emésztése esetén.

### **III. 4. 4. „Jelzés nélküli” kvantifikálás**

A mikrovezikulumokban és apoptotikus testekben található hiszton mennyiségét „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.

## **IV. EREDMÉNYEK**

### **IV. 1. Az extracelluláris vezikulumok feltárása**

Első feladatomban a vezikulumok feltárásának megoldása volt olyan eljárással, mely a később alkalmazandó nanoUPLC-MS analitikát nem zavarja. A fehérjék extrakciójára három módszert hasonlítottam össze.

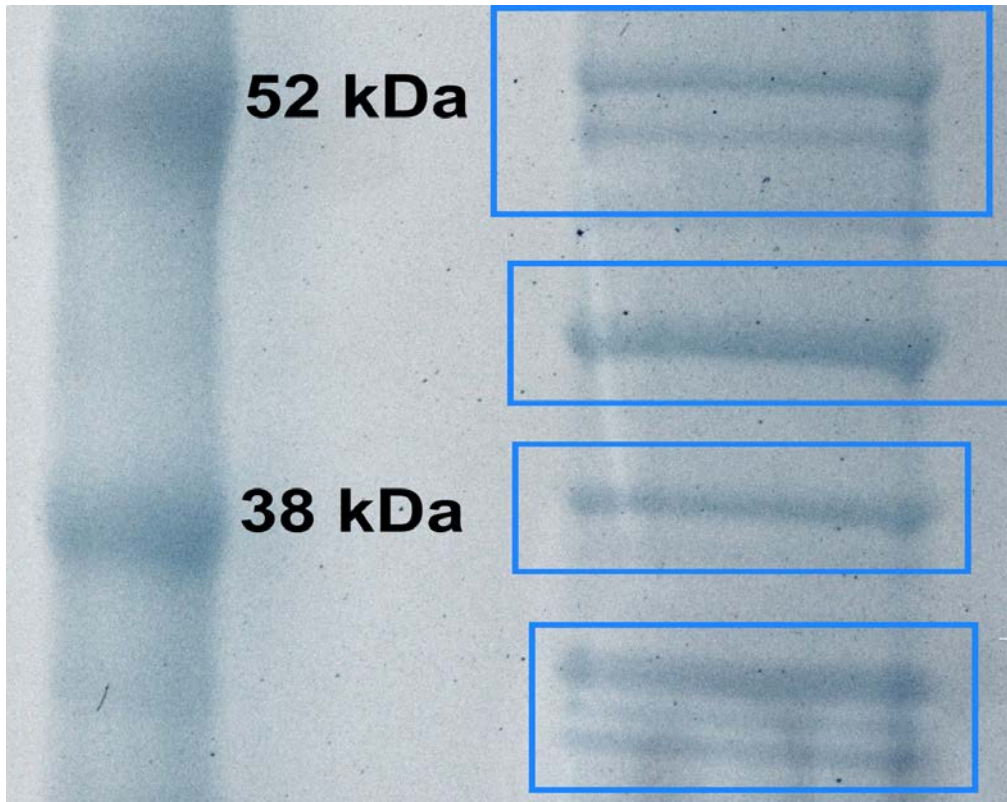
#### **IV. 1. 1. Felületaktív anyagokkal**

Az első esetben az extracelluláris vezikulum frakciót különböző felületaktív anyagok hatásának tettem ki a III. 2. 1. fejezetben leírtak szerint. A mintaelőkészítés ebben az esetben viszonylag kevés, 13 lépésből állt. A felületaktív anyagok alkalmazásának nagy hátránya azonban, hogy a vezikulumok membránjának felbontásához szükséges koncentrációban már zavarják a tömegspektrometriás méréseket. Méréseim során azt tapasztaltam, hogy a detergenspektrumban észlelt jelei elnyomják a vezikulumok fehérjéinek jeleit és nem tudtam a tandem tömegspektrometriai mérések alapján vezikulumokból fehérjéket azonosítani.

#### **IV. 1. 2. Gélelektroforézissel**

A következő módszer, amelyet alkalmaztam, a minta közvetlen SDS poliakrilamid gélen történő futtatása és emésztése volt a III. 2. 2. fejezetben leírtak szerint. Az 5. ábrán egy általam futtatott gélelektroferogram részlete látható. Az ábra bal oldalán a molekulasúly markerek találhatók.

A bekeretezett gélcsíkokat kivágtam, megemésztettem tripszinnel, majd következett a tömegspektrometriás analízis. Van olyan bekeretezett rész, ahol több fehérjecsík is látható. Ez a meghatározást nem zavarta, ezekben a mintákban több fehérje jelenlétét mutattam ki. A módszer alkalmazásával néhány fehérjét azonosítottam a vezikulum mintákban. A mintaelőkészítés azonban elég hosszadalmas 46 lépés, körülbelül 2 nap. Továbbá 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 mintaelőkészítési eljárást szerettem volna kidolgozni.



**5. ábra Jurkat T-sejt eredetű extracelluláris vezikulum gélelektroferogramja (baloldalon a molekulásúly markerekkel).**

#### **IV. 1. 3. Fagyasztás-olvasztás eljárással**

Az általam kifejlesztett kevésbé időigényes mintaelőkészítési eljárás a fagyasztás-olvasztás alkalmazása volt. 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  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on (1 óra) történő fagyasztást tartalmazó módszert választottam a vezikulumok felbontására. A két fagyasztási módszert együttesen tartalmazó protokollt hatásosabbnak találtam a csak folyékony nitrogént vagy csak  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő fagyasztást tartalmazó protokolloknál. Főként a membránfehérjék azonosítása szempontjából volt előnyös ezek kombinálása.

A mintaelőkészítés lényegesen rövidebb a gélelektroforézisnél; 19 lépés szemben a 46 lépéssel. Ezzel az eljárással körülbelül négyszer több fehérjét azonosítottam a vezikulum mintában. Ez a módszer gyorsnak, egyszerűnek és hatékonynak bizonyult a vezikulumokban található fehérjék kiszabadítására.

## **IV. 2. Protokoll kidolgozása kis mennyiségű anyagok emésztésére**

Az előkísérletek során azt tapasztaltam, hogy a kis mennyiségben rendelkezésre álló vezikulumok fehérjéinek analízise az irodalmi emésztési módszerekkel nem valósítható meg. Ezért szükségessé vált a tripszines emésztési protokoll miniaturizálása, illetve kis anyagmennyiségre és mintatérfogatra történő optimalálása.

Olyan módszer kidolgozása volt a célom, ami jól működik

- a) kis mintatérfogat esetén
- b) amikor az összfehérje mennyiség limitált (<5 pmol)
- c) képes fehérjekeverékek minor komponenseinek azonosítására
- d) fél-kvantitatív eredményeket szolgáltat

A kidolgozott protokoll részletes leírása a III.3.3 fejezetben található.

### **IV. 2. 1. A kidolgozott protokoll reprodukálhatósága, robusztussága**

A protokoll kidolgozása során humán plazma mintát emésztettem. Mielőtt a kidolgozott protokollt a nagy térfogatú oldószereket alkalmazó [109, 110] irodalmi protokollok eredményéhez hasonlítottam volna, ellenőriztem a módszer reprodukálhatóságát. Három emésztés eredményeit (melyet különböző személyek különböző napokon készítettek) hasonlítottam össze az azonosított fehérjék száma és a kiválasztott csúcsok területe alapján. Az eredményeket a 4. táblázatban mutatom be.

4. táblázat A „Mini” emésztési protokoll reprodukálhatósága.

	Reprodukálás			
	„Mini” protokoll (egyedi adatok)	Mini 1	Mini 2	Mini 3
<b>Azonosított fehérjék száma</b>				
"szigorú" követelmény	8	8	8	9
"laza" követelmény	20	20	16	18
<b>Csúcsterületek:</b>				
<b>BLG m/z 858,40</b>	12 500	12 200	12 200	12 400
<b>Albumin m/z 1013,60</b>	10 500	13 800	13 800	14 500
<b>Transzferrin m/z 708,35</b>	3 130	3 260	3 260	3 180
<b>Ig gamma lánc m/z 839,39</b>	792	1 020	1 020	1 000

A választott csúcsok esetén a csúcsterületek relatív szórása 8,3% volt. Az azonosított fehérjék száma a „laza” kritériumok esetén 16 és 20 között változott. Az ilyen mértékű pontosság a legtöbb proteomikai vizsgálat esetén teljesen elfogadható, különösképpen, ha figyelembe vesszük, hogy az emésztés során több esetben is 1  $\mu\text{L}$  térfogatú reagenst adtam a mintához. Ezen kívül a mért ionintenzitások is rendelkeznek egy adott szórással.

#### **IV. 2. 2. A kidolgozott protokoll jellemzésére használt mérőszámok, irodalmi adatokkal történő összevetése**

A „Mini” protokollal kapott eredményeket két másik emésztési protokoll eredményeivel vettem össze, melyek nagyobb mintamennyiségek nagy térfogatú emésztésére alkalmasak (A és B protokoll [109, 110]). Annak érdekében, hogy az eredmények a „Mini” protokollal összehasonlíthatóak legyenek, az A és B protokoll esetén tízszer nagyobb térfogatban tízszeres anyagmennyiséget emésztettem és 2  $\mu\text{L}$  mintát injektáltam. Így minden injektálás során azonos mennyiségű 400 fmol albuminnak és 260 fmol BLG-nek megfelelő mennyiségű mintát juttattam az oszlopra.

A kidolgozott protokollok teljesítőképességét a következő mérőszámokkal jellemeztem: (a) azonosított fehérjék száma. A fehérjék azonosítása szekvencia darabokon (MS/MS) alapul, a III. 4. 3. fejezetben leírt két kritérium („laza” és „szigorú”) alapján. (b) A HPLC-MS kromatogramban észlelt jelintenzitások összehasonlítása. A különböző fehérjékhez tartozó kiválasztott peptidek csúcsterületeit külön HPLC-MS futásokból határoztam meg. Ehhez a következő peptidfragmenseket választottam ki: egy belső standardhoz tartozót (BLG,  $m/z$  858.40); egy fő fehérje komponenshez tartozót (albumin,  $m/z$  1013.60); és két kisebb mennyiségben jelenlévő komponenshez tartozót (transzferrin,  $m/z$  708.35; és immunoglobulin gamma lánc,  $m/z$  839.39). A minor komponensek esetén körülbelül 30-40 fmol került az oszlopra az injektálás során. Számos további azonosított fehérje mennyisége a 1-10 fmol tartományban volt. A három emésztési protokollal kapott eredményeket az 5. táblázatban foglaltam össze.

5. táblázat Az azonosított fehérjék száma és a kiválasztott csúcsterületek a különböző emésztési protokollok esetén.

Azonosított fehérjék száma	Protokollok			
	„Mini” protokoll <sup>2</sup>	A <sup>2</sup>	B <sup>2</sup>	B <sup>2</sup> (visszaoldással)
„szigorú” követelmény	8	3	6	0
„laza” követelmény	18	16	17	2
<b>Csúcsterületek:</b>				
<b>BLG 858.40</b>	12 366 ± 1%	12 010 ± 36%	15 470 ± 10%	580 ± 78%
<b>Albumin 1013.60</b>	12 930 ± 16%	7 810 ± 3%	10 820 ± 4%	1 184 ± 53%
<b>Transzferrin 708.35</b>	3 190 ± 2%	1 590 ± 61%	2 120 ± 7%	< 70 <sup>1</sup>
<b>Ig gamma lánc 839.39</b>	937 ± 13%	690 ± 47%	1 230 ± 21%	< 70 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> nincs jelen (kisebb, mint 70 egység)<sup>2</sup> három különböző emésztés átlaga

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a „Mini” protokoll legalább olyan eredményes, mint a „standard” protokollok. A belső standardhoz tartozó csúcshemoglobint intenzitása gyakorlatilag mindhárom esetben azonos. A plazmafehérjék peptidjei tipikusan a kifejlesztett „Mini” protokoll esetén a legintenzívebbek. Különösen fontos, hogy ezzel a protokollal tudtam a legtöbb fehérjét azonosítani, mind a „szigorú” mind pedig a „laza” követelményekkel. Az intenzívebb jelintenzitásokhoz és a további minor fehérje komponensek azonosításához hozzájárulhatott a RapiGest mennyiségének csökkentése és tripszin mennyiségének növelése is.

Végeztem vizsgálatot azonos mennyiségű fehérje (5 pmol összfehérje mennyiség) B protokoll szerinti nagyterefogatú (61  $\mu\text{L}$ ) emésztése esetén úgy is, hogy az emésztést követően a mintát bepároltam, majd 15  $\mu\text{L}$  térfogatban visszaoldottam és 2  $\mu\text{L}$  részletét vizsgáltam. A jelintenzitások azonban így legalább tízszer kisebbek voltak; mindössze két fehérjét, az albumint és a BLG-t tudtam azonosítani a „laza” követelmények alkalmazásával is. Emellett a reprodukálási eredmények is nagyon rosszak voltak. A minta bepárlása tehát elkerülendő, hiszen jelentős mintavesztéshez vezet.

Egy további vizsgálatot is elvégeztem annak megfigyelésére, hogy a protokollban bevezetett tetszőleges, kismértékű változtatások milyen mértékben befolyásolják a kapott eredményt. Ennek érdekében a RapiGest mennyiségét kétszeresére a puffer mennyiségét pedig 50%-kal növeltem, míg a DTT, jódcetamid és tripszin mennyiségét 10%, 25% és 50%-kal csökkentettem. Az eredmények csak kismértékben változtak (20 fehérjét azonosítottam; a csúcsterületek esetén a szórás a „Mini” protokollhoz viszonyítva átlagban 16% volt). Ezzel igazoltam, hogy a kidolgozott protokoll robusztus; nem érzékeny a reagensek mennyiségének kismértékű változása iránt.

#### **IV. 2. 3. A „Mini” protokoll alkalmazhatósága kis mintamennyiség esetén**

Végző ellenőrzésként megvizsgáltam a protokoll alkalmazhatóságát rendkívül kis mennyiségű (a 2 pmol mennyiségben található BLG-t leszámítva 300, 100 és 50 fmol összfehérje mennyiségnek megfelelő) fehérje emésztése esetén. Ehhez a plazma mintát tovább hígítottam 10, 30 és 60-szorosára; így 10  $\mu\text{L}$  oldat 300, 100 és 50



fentmolnyi albumint (és egyéb minor plazma komponenseket) tartalmazott. A mintákhoz 2 pmol BLG belső standardot is adtam és a mintát a kísérleti részben leírt „Mini” protokoll szerint emésztettem. Ebben az esetben az emésztett mintából 2  $\mu\text{L}$  helyett a maximális 5  $\mu\text{L}$ -t injektáltam a nanoUPLC oszlopra. Az eredmények (6. táblázat) is alátámasztják, hogy még ilyen kis fehérjemennyiség is sikeresen megemészthető jelentős mintaveszteség nélkül, hiszen az albumin mellett egyéb minor plazma komponenseket is azonosítottam, miközben az emésztett összfehérje mennyiség mindössze kb. 110 fmol (13 ng) volt.

6. táblázat A „Mini” emésztési protokoll alkalmazhatósága kismennyiségű fehérjét tartalmazó minta esetében.

Azonosított fehérjék száma	Kismennyiségű fehérjekeverék emésztése		
	300 fmol emésztve, 100 fmol injektálva	100 fmol emésztve 33 fmol injektálva	50 fmol emésztve 17 fmol injektálva
"szigorú" követelmény	2	2	2
"laza" követelmény	5	3	2
<b>Csúcsterületek:</b>			
BLG 858.40	15 500	15 300	13 600
Albumin 1013.60	4 660	1 590	1 320
Transzferrin 708.35	396	147	< 70 <sup>1</sup>
Ig gamma lánc 839.39	137	< 70 <sup>1</sup>	< 70 <sup>1</sup>

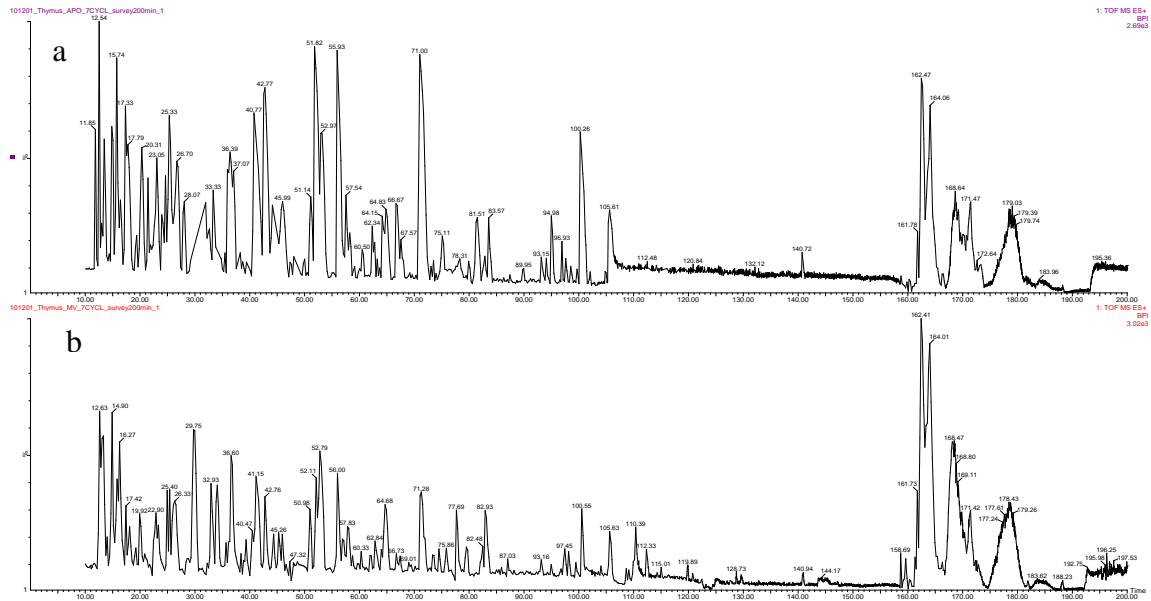
<sup>1</sup> nem található (kisebb, mint 70 egység)

### **IV. 3. Thymocyta-eredetű mikrovezikulumok és apoptotikus testek proteomikai jellemzése**

Thymus eredetű extracelluláris vezikulumok proteomikai vizsgálatáról ezidáig nem számoltak még be. Mivel a thymus kiemelt szerepet játszik az immunsejtek érésében és az immunválasz kialakulásában, fontosnak tartottuk a thymus sejtek által szekretált mikrovezikulumok és apoptotikus testek fehérjéinek azonosítását. Miután megoldottam a vezikulumok feltárását és a kis mintamennyiség sikeres emésztését, következő feladatomban a peptidok elválasztására alkalmazott kromatográfia optimalizálása és a tömegspektrometriai felvételek kiértékelése volt.

#### **IV. 3. 1. A kromatográfiai paraméterek optimalizálása**

A fehérjék emésztését követően a triptikus peptidokat nanoUPLC-MS(MS)-sel vizsgáltam. Tekintettel arra, hogy a vezikulumok rendkívül összetett biológiai minták és sok fehérjét tartalmaznak, a kromatográfia időtartamának optimalizálása volt az elsődleges szempont. A gradiens idejének növelésével a csúskapacitás növelhető. Különböző idejű gradienseket alkalmaztam 70 és 250 perc között. Mérési eredményeim szerint a kromatográfiai elválasztás körülményeitől függően a legtöbb fehérjét a 150 perces gradiens alkalmazásával azonosítottam. A 6. ábrán megfigyelhető, hogy még 150 perces gradiens (III.4.1 fejezet) alkalmazása során is sűrűn találhatók a csúcsok a kromatogramon. A gradiens hosszának további növelése azonban nem növeli az azonosított fehérjék számát.



6. ábra Thymus eredetű apoptotikus test (a) és mikrovezikulum (b) minták tripszines emésztést követő báziscsúcs kromatogramja.

#### IV. 3. 2. Azonosított fehérjék

Az egér thymus sejtekből származó apoptotikus testekben 142, míg a mikrovezikulumokban 195 fehérjét azonosítottam. A thymus eredetű apoptotikus testekben és mikrovezikulumokban azonosított egyedi és közös fehérjék listáját a 7. táblázat tartalmazza. Az egyes fehérjékhez azonosított peptidok listája mérete miatt a dolgozatban nem szerepel, a lista megtalálható a <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.023> címen.

**7. táblázat Thymus eredetű mikrovezikulumokban és apoptotikus testekben azonosított fehérjék az egyedi peptidszámmal és szekvencia lefedettséggel**

Fehérje azonosító	Mikrovezikulum		Apoptotikus test	
	Egyedi peptidek száma	Szekvencia lefedettség	Egyedi peptidek száma	Szekvencia lefedettség
1433E_MOUSE	3	15.70%	200.00%	15.70%
1433T_MOUSE	2	21.60%	0.00%	0.00%
1433Z_MOUSE	5	23.70%	400.00%	29.80%
2AAA_MOUSE	2	7.98%	0.00%	0.00%
4F2_MOUSE	8	26.00%	0.00%	0.00%
6PGL_MOUSE	3	28.80%	0.00%	0.00%
ABI3_MOUSE	2	8.17%	0.00%	0.00%
ACADL_MOUSE	0	0.00%	300.00%	14.20%
ACON_MOUSE	0	0.00%	400.00%	9.49%
ACTB_MOUSE,ACTG_MOUSE	18	68.50%	2100.00%	73.60%
ACTC_MOUSE,ACTS_MOUSE	2	22.30%	200.00%	22.30%
ACTN4_MOUSE	4	7.79%	200.00%	4.39%
ADA_MOUSE	2	14.20%	0.00%	0.00%
ADT2_MOUSE	0	0.00%	200.00%	13.80%
ALBU_MOUSE	0	0.00%	200.00%	4.44%
ALDH2_MOUSE	0	0.00%	200.00%	6.94%
ALDOA_MOUSE	2	9.34%	0.00%	0.00%
AN32A_MOUSE	2	18.20%	0.00%	0.00%
AN32E_MOUSE	2	12.70%	0.00%	0.00%
ANK1_MOUSE	0	0.00%	400.00%	4.51%
ANX11_MOUSE	2	6.36%	0.00%	0.00%
ANXA2_MOUSE	7	39.80%	800.00%	26.30%
ANXA5_MOUSE	4	21.90%	200.00%	9.72%
ANXA6_MOUSE	17	36.10%	200.00%	4.90%
AQP1_MOUSE	0	0.00%	200.00%	23.40%
ARF1_MOUSE,ARF3_MOUSE	2	19.90%	300.00%	27.60%
ARP2_MOUSE	3	17.00%	300.00%	12.70%
ARP3_MOUSE	5	26.80%	300.00%	18.90%
AT1A1_MOUSE	17	21.60%	1300.00%	18.50%
AT1B1_MOUSE	2	8.22%	0.00%	0.00%
AT1B3_MOUSE	3	22.30%	0.00%	0.00%
ATPA_MOUSE	3	10.50%	700.00%	15.70%
ATPB_MOUSE	4	15.10%	1500.00%	47.80%
B3AT_MOUSE	3	5.17%	900.00%	20.50%
BASI_MOUSE	3	9.77%	200.00%	7.20%
C1QBP_MOUSE	0	0.00%	200.00%	20.10%
CALM_MOUSE	2	36.20%	0.00%	0.00%
CALX_MOUSE	2	9.48%	0.00%	0.00%
CAP1_MOUSE	4	13.10%	200.00%	8.65%
CAPZB_MOUSE	2	16.20%	0.00%	0.00%
CATD_MOUSE	3	17.60%	200.00%	10.70%
CAZA1_MOUSE	2	9.79%	200.00%	9.79%
CD45_MOUSE	14	19.40%	900.00%	14.90%
CD5_MOUSE	5	15.80%	0.00%	0.00%

Fehérje azonosító	Mikrovezikulum		Apoptotikus test	
	Egyedi peptidek száma	Szekvencia lefedettség	Egyedi peptidek száma	Szekvencia lefedettség
CD97_MOUSE	2	3.55%	0.00%	0.00%
CDC42_MOUSE	2	16.80%	0.00%	0.00%
CH60_MOUSE	0	0.00%	600.00%	17.30%
CHM4B_MOUSE	2	12.10%	0.00%	0.00%
CISY_MOUSE	0	0.00%	300.00%	18.30%
CLH_MOUSE	15	17.70%	400.00%	3.16%
CLIC1_MOUSE	3	16.60%	200.00%	14.10%
CN37_MOUSE	2	9.76%	0.00%	0.00%
COF1_MOUSE	5	47.00%	500.00%	44.00%
COR1A_MOUSE	7	28.00%	600.00%	25.80%
COX2_MOUSE	2	26.00%	300.00%	30.40%
COX5A_MOUSE	2	31.00%	0.00%	0.00%
DDX5_MOUSE	4	8.63%	200.00%	3.75%
DEK_MOUSE	2	6.84%	0.00%	0.00%
DHSA_MOUSE	0	0.00%	200.00%	7.23%
DHX9_MOUSE	3	3.19%	0.00%	0.00%
DPP4_MOUSE	3	5.53%	0.00%	0.00%
ECHB_MOUSE	0	0.00%	200.00%	9.05%
EF1A1_MOUSE	8	31.60%	800.00%	36.80%
EF2_MOUSE	13	23.70%	600.00%	12.50%
EFTU_MOUSE	0	0.00%	200.00%	7.30%
ENOA_MOUSE	8	34.80%	800.00%	32.00%
ENPL_MOUSE	2	6.98%	200.00%	4.11%
ETFA_MOUSE	0	0.00%	200.00%	12.00%
EZRI_MOUSE	4	12.60%	300.00%	10.90%
FA62A_MOUSE	2	4.12%	0.00%	0.00%
FAS_MOUSE	2	1.80%	0.00%	0.00%
FMNL_MOUSE	5	8.14%	200.00%	3.02%
G3P_MOUSE	11	45.90%	1200.00%	53.80%
GBB1_MOUSE	5	34.40%	0.00%	0.00%
GBB2_MOUSE	8	41.80%	300.00%	15.60%
GBLP_MOUSE	2	10.10%	0.00%	0.00%
GDIB_MOUSE	5	16.90%	300.00%	14.20%
GDIR_MOUSE	3	27.90%	200.00%	20.10%
GDIS_MOUSE	5	53.50%	0.00%	0.00%
GNA13_MOUSE	2	9.55%	0.00%	0.00%
GNAI2_MOUSE	8	35.80%	400.00%	23.90%
GNAI3_MOUSE	3	24.60%	200.00%	16.70%
GRP75_MOUSE	0	0.00%	400.00%	8.39%
GRP78_MOUSE	3	9.01%	500.00%	13.40%
GSTP1_MOUSE	3	25.70%	0.00%	0.00%
H12_MOUSE	6	20.80%	500.00%	17.50%
H15_MOUSE	4	15.20%	200.00%	5.83%
H2A2A_MOUSE,H2A2C_MOUSE	2	50.80%	200.00%	45.40%
H2AV_MOUSE,H2AZ_MOUSE	2	33.60%	200.00%	33.60%
H2AX_MOUSE	4	46.20%	400.00%	47.60%
H2AY_MOUSE	2	10.20%	0.00%	0.00%
H2B1B_MOUSE,H2B1F_MOUSE, H2B1K_MOUSE,H2B1P_MOUSE	6	49.20%	600.00%	41.30%
H33_MOUSE	4	43.40%	500.00%	43.40%

Fehérje azonosító	Mikrovezikulum		Apoptotikus test	
	Egyedi peptidek száma	Szekvencia lefedettség	Egyedi peptidek száma	Szekvencia lefedettség
H4_MOUSE	10	50.50%	900.00%	58.30%
HA12_MOUSE	3	11.00%	300.00%	9.59%
HA21_MOUSE,HA22_MOUSE	4	31.80%	0.00%	0.00%
HA2D_MOUSE	4	26.20%	300.00%	26.20%
HB22_MOUSE	3	23.10%	0.00%	0.00%
HB2D_MOUSE	6	31.30%	300.00%	22.30%
HBA_MOUSE	4	43.00%	800.00%	90.10%
HBB1_MOUSE	3	27.90%	1000.00%	85.00%
HBB2_MOUSE	2	21.80%	300.00%	51.70%
HCDH_MOUSE	0	0.00%	200.00%	18.80%
HMGB1_MOUSE	2	14.40%	200.00%	14.40%
HMGB2_MOUSE	2	14.80%	0.00%	0.00%
HNRPF_MOUSE	4	22.70%	200.00%	12.00%
HNRPM_MOUSE	3	7.00%	0.00%	0.00%
HS90A_MOUSE	10	18.30%	500.00%	15.10%
HS90B_MOUSE	16	32.70%	1000.00%	19.50%
HSP74_MOUSE	2	3.92%	0.00%	0.00%
HSP7C_MOUSE	15	30.80%	900.00%	16.70%
IDH3A_MOUSE	0	0.00%	200.00%	9.56%
IF4A1_MOUSE	4	21.20%	400.00%	22.90%
IF5A1_MOUSE	2	22.70%	0.00%	0.00%
IQGA1_MOUSE	3	3.08%	300.00%	3.08%
ITA6_MOUSE	4	7.88%	0.00%	0.00%
ITAL_MOUSE	8	13.50%	0.00%	0.00%
ITB1_MOUSE	3	6.14%	0.00%	0.00%
ITB2_MOUSE	7	15.70%	200.00%	6.23%
K1C10_MOUSE	3	8.42%	400.00%	8.07%
K2C5_MOUSE	2	3.62%	0.00%	0.00%
KPYM_MOUSE	10	29.90%	600.00%	23.40%
LAP2_MOUSE	3	3.71%	0.00%	0.00%
LAT_MOUSE	2	15.70%	0.00%	0.00%
LCK_MOUSE	9	26.70%	400.00%	11.20%
LDHA_MOUSE	5	24.10%	300.00%	11.70%
LDHB_MOUSE	3	18.60%	300.00%	17.10%
LEG1_MOUSE	2	20.70%	0.00%	0.00%
LGUL_MOUSE	2	20.10%	0.00%	0.00%
LMNB1_MOUSE	3	8.16%	200.00%	6.12%
LSP1_MOUSE	0	0.00%	0.00%	10.90%
LY6D_MOUSE	2	21.30%	0.00%	0.00%
MDHC_MOUSE	6	34.70%	400.00%	18.00%
MDHM_MOUSE	4	17.50%	900.00%	37.00%
MOES_MOUSE	16	35.90%	700.00%	16.30%
MPCP_MOUSE	0	0.00%	200.00%	10.90%
MPRD_MOUSE	2	16.20%	0.00%	0.00%
MYH9_MOUSE	9	7.96%	1500.00%	13.40%
MYL6_MOUSE	2	15.90%	200.00%	15.90%
NDKA_MOUSE	4	37.50%	200.00%	17.10%
NDUA9_MOUSE	0	0.00%	200.00%	10.60%
NP1L1_MOUSE	2	12.30%	0.00%	0.00%

Fehérje azonosító	Mikrovezikulum		Apoptotikus test	
	Egyedi peptidek száma	Szekvencia lefedettség	Egyedi peptidek száma	Szekvencia lefedettség
NP1L4_MOUSE	3	11.70%	0.00%	0.00%
NPM_MOUSE	3	21.20%	0.00%	0.00%
NT5C_MOUSE	2	23.00%	0.00%	0.00%
NUCL_MOUSE	7	13.40%	0.00%	0.00%
ODPB_MOUSE	0	0.00%	200.00%	7.52%
PARK7_MOUSE	3	29.10%	0.00%	0.00%
PCBP1_MOUSE	4	21.90%	0.00%	0.00%
PCBP2_MOUSE	2	7.46%	0.00%	0.00%
PDC6I_MOUSE	5	10.10%	0.00%	0.00%
PDIA1_MOUSE	0	0.00%	200.00%	10.80%
PDIA3_MOUSE	2	4.76%	400.00%	10.50%
PGK1_MOUSE	5	26.10%	300.00%	14.90%
PHB2_MOUSE	0	0.00%	300.00%	16.40%
PLSL_MOUSE	6	18.50%	300.00%	9.41%
PP1A_MOUSE,PP1B_MOUSE, PP1G_MOUSE	2	10.60%	600.00%	53.00%
PPIA_MOUSE	6	38.40%	0.00%	0.00%
PRDX1_MOUSE	4	29.10%	300.00%	22.10%
PRDX2_MOUSE	5	26.80%	600.00%	45.50%
PRDX6_MOUSE	2	16.50%	0.00%	0.00%
PROF1_MOUSE	4	29.30%	400.00%	48.60%
PSA5_MOUSE	0	0.00%	200.00%	10.40%
PSB3_MOUSE	2	18.00%	0.00%	0.00%
PSB4_MOUSE	0	0.00%	200.00%	14.00%
PTBP1_MOUSE	3	13.90%	200.00%	8.16%
PUR6_MOUSE	2	6.82%	0.00%	0.00%
RAB5C_MOUSE	3	18.50%	300.00%	18.50%
RAB7_MOUSE	2	15.50%	0.00%	0.00%
RAB8B_MOUSE	3	17.40%	0.00%	0.00%
RAC1_MOUSE	6	44.30%	300.00%	18.20%
RAC2_MOUSE	4	39.60%	300.00%	40.60%
RAN_MOUSE	4	21.80%	200.00%	11.60%
RAP1B_MOUSE	6	52.70%	400.00%	29.30%
RAP2C_MOUSE	2	15.30%	0.00%	0.00%
RB11B_MOUSE	2	10.10%	0.00%	0.00%
RHOA_MOUSE	5	46.10%	400.00%	26.90%
RHOG_MOUSE	3	31.90%	200.00%	19.90%
RL3_MOUSE	2	6.45%	200.00%	11.90%
RL4_MOUSE	2	8.35%	0.00%	0.00%
RL7_MOUSE	2	12.20%	0.00%	0.00%
RL8_MOUSE	2	12.10%	0.00%	0.00%
RLA2_MOUSE	2	27.00%	200.00%	27.00%
ROA2_MOUSE	3	14.40%	0.00%	0.00%
ROAA_MOUSE	2	12.30%	0.00%	0.00%
RS18_MOUSE	2	13.20%	0.00%	0.00%
RS2_MOUSE	3	11.90%	0.00%	0.00%
RS3_MOUSE	0	0.00%	300.00%	18.50%
RS6_MOUSE	0	0.00%	200.00%	8.03%
RS7_MOUSE	2	11.90%	0.00%	0.00%
RS8_MOUSE	4	23.60%	300.00%	18.80%

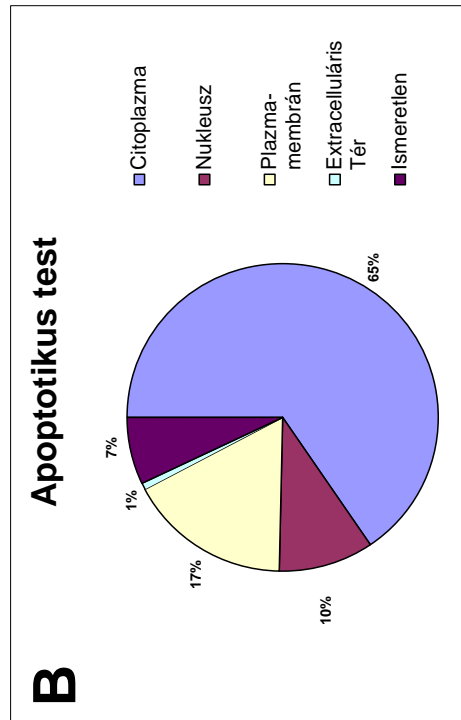
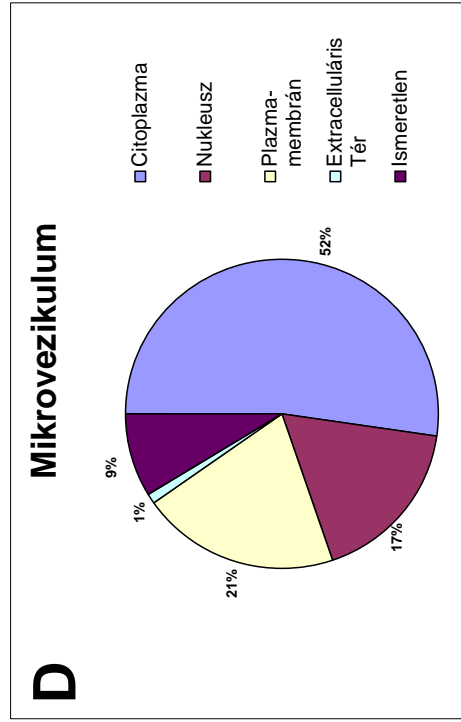
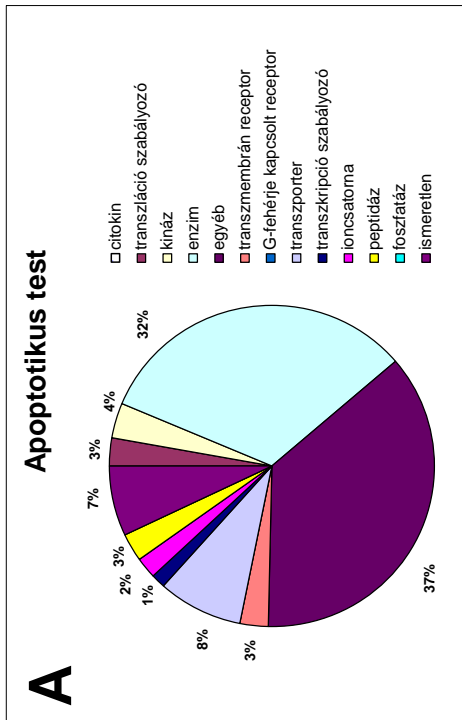
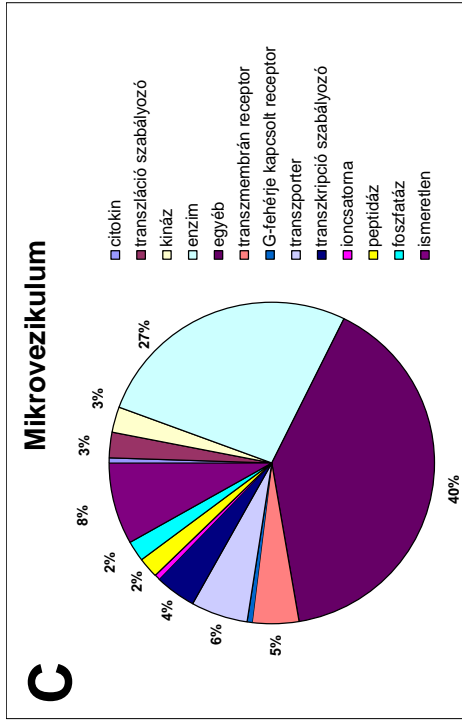


Fehérje azonosító	Mikrovezikulum		Apoptotikus test	
	Egyedi peptidek száma	Szekvencia lefedettség	Egyedi peptidek száma	Szekvencia lefedettség
RSSA_MOUSE	2	9.49%	200.00%	10.20%
SDCB1_MOUSE	2	14.70%	0.00%	0.00%
SERA_MOUSE	2	5.44%	0.00%	0.00%
SET_MOUSE	3	20.40%	0.00%	0.00%
SFRS1_MOUSE	6	30.20%	0.00%	0.00%
SFRS5_MOUSE	2	8.89%	0.00%	0.00%
SODC_MOUSE	2	14.90%	200.00%	14.90%
SPTA1_MOUSE	0	0.00%	800.00%	7.12%
SPTB1_MOUSE	0	0.00%	200.00%	1.55%
STAT1_MOUSE	2	3.74%	0.00%	0.00%
TADBP_MOUSE	2	14.50%	0.00%	0.00%
TAGL2_MOUSE	2	15.10%	0.00%	0.00%
TBA2_MOUSE	10	33.90%	600.00%	23.30%
TBB2C_MOUSE	2	29.70%	0.00%	0.00%
TBB5_MOUSE	16	52.90%	800.00%	31.30%
TCP4_MOUSE	2	18.90%	0.00%	0.00%
TCPA1_MOUSE,TCPA2_MOUSE	4	15.60%	200.00%	5.76%
TCPB_MOUSE	3	10.30%	200.00%	6.36%
TCPD_MOUSE	5	20.00%	400.00%	16.50%
TCPE_MOUSE	4	19.40%	300.00%	11.30%
TCPG_MOUSE	4	11.60%	200.00%	7.34%
TCPH_MOUSE	2	9.01%	0.00%	0.00%
TCPZ_MOUSE	2	8.29%	0.00%	0.00%
TERA_MOUSE	7	13.40%	500.00%	9.93%
THIL_MOUSE	0	0.00%	200.00%	9.67%
THIM_MOUSE	0	0.00%	500.00%	23.40%
THY1_MOUSE	5	25.90%	500.00%	25.90%
TKT_MOUSE	5	12.20%	300.00%	9.47%
TLN1_MOUSE	10	9.17%	0.00%	0.00%
TM16F_MOUSE	2	4.28%	0.00%	0.00%
TPIS_MOUSE	5	41.80%	200.00%	19.30%
UBE1X_MOUSE	6	10.10%	300.00%	5.10%
UBIQ_MOUSE	2	32.90%	0.00%	0.00%
UQCR2_MOUSE	0	0.00%	200.00%	5.52%
URP2_MOUSE	5	12.80%	200.00%	4.21%
VDAC1_MOUSE	0	0.00%	300.00%	14.50%
VDAC2_MOUSE	0	0.00%	200.00%	10.80%
WASF2_MOUSE	3	9.05%	0.00%	0.00%

A Genetikai-, Sejt- és Immunbiológiai Intézet munkatársai validáltak néhány, a tömegspektrometriai mérés során azonosított fehérjét. Az Annexin V fehérjét áramlási citometriával is detektálták mind az apoptotikus testekben mind a mikrovezikulumokban. Az apoptotikus testekhez és a teljes sejthez viszonyítva is a mikrovezikulumok kevesebb felszíni annexin V-t tartalmaztak. Néhány további fehérje jelenlétét pedig Western Blottal igazolták.

Érdekes módon a fehérjék nagy részét (47%) mindkét vezikulum populációban azonosítottam. Az egyedi, mikrovezikulumokra jellemző fehérjék száma (38%) meghaladta az apoptotikus testekre jellemző fehérjékét (15%).

Az azonosított citoplazmatikus és membránfehérjék aránya a fehérjék száma alapján az apoptotikus testben 3,82; a mikrovezikulumban 2,47, ami jól korrelál a kisebb méretű vezikulumok relatív nagyobb membránfelület méretével. Az azonosított fehérjék között szerepeltek enzimek (pl. kinázok, peptidázok), transzporterek, citokinek, ioncsatorna alkotók, transzkripció és transláció szabályozók, transzmembrán receptorok (pl. G-fehérje-kapcsoltak), stb.. A 7 A és C ábrán mutatom be eloszlásukat az AT-ben és MV-ban, míg a 7 B és D ábrán az azonosított fehérjék szubcelluláris lokalizációját mutatom be a két vezikulum populációban.



7. ábra Thymocyta-eredetű apoptotikus testek és mikrovezikulumok fehérjéinek eloszlása funkcióik (7 A és C ábra) és szubcelluláris lokalizációjuk (7 B és D ábra) szerint

A két minta fehérjéi között egyaránt megtalálhatóak a citoskeletális fehérjék (aktin és tubulin), citoskeletális kötőfehérjék (ezrin, moezin, kofilin 1), metabolikus enzimek (gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz, alfa-enoláz, malát-dehidrogenáz 1, laktát-dehidrogenáz A és B) és dajkafehérjék (T-komplex fehérje alegységek, hsp90). Érdekes, hogy mind a mikrovezikulumok, mind az apoptotikus testek jelentős mennyiségben tartalmaztak különböző hisztonokat. A mintákban a hisztonok relatív mennyiségét „jelzés nélküli” kvantifikálással, kiválasztott csúcsintenzitások figyelembevételével határoztam meg. Az egyes hiszton családok relatív mennyiségét szintén meghatároztam. Az adott fehérje három legintenzívebb peptid ionkromatogramjának intenzitása alapján a hisztonok relatív mennyisége az apoptotikus testben az összfehérje mennyiség 20,3%-a, míg a mikrovezikulumokban 6,1%-a (8. táblázat). Az azonosított hisztonokat hiszton családokba soroltam és a családok relatív mennyiségét szintén meghatároztam (8. táblázat)

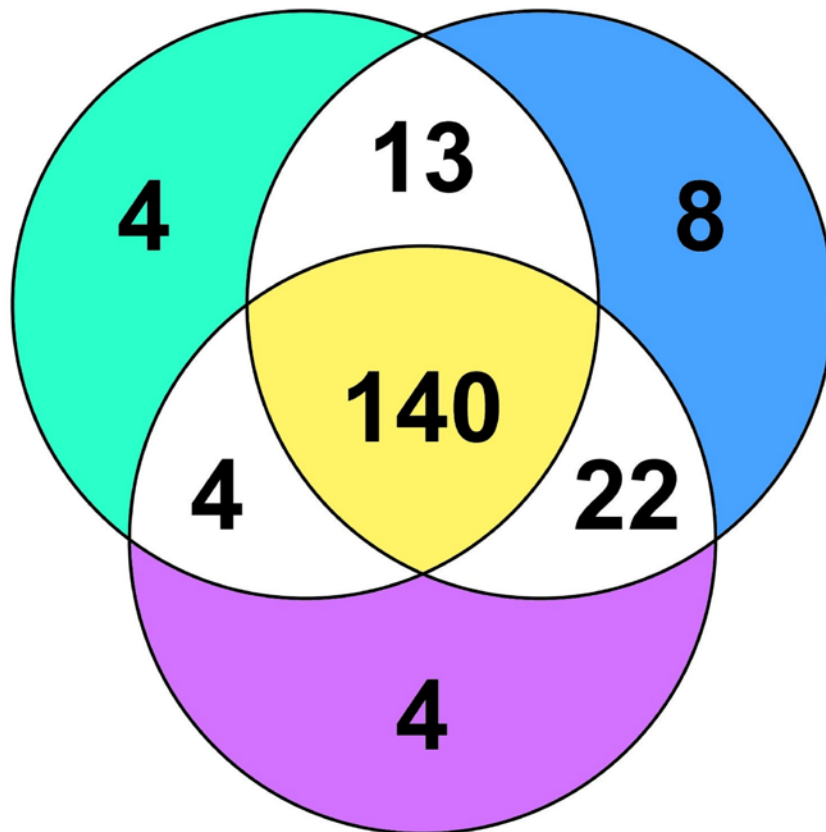
**8. táblázat. A hisztonok relatív mennyisége thymus eredetű apoptotikus testben és mikrovezikulumban.**

	<b>Apoptotikus test</b>	<b>Mikrovezikulum</b>
	%	%
<b>Összes hiszton</b>	<b>20,3</b>	<b>6,1</b>
<b>Hiszton H1 család</b>	<b>1,8</b>	<b>0,6</b>
<b>Hiszton H2A család</b>	<b>5,4</b>	<b>1,2</b>
<b>Hiszton H2B család</b>	<b>5,2</b>	<b>1,6</b>
<b>Hiszton H3 család</b>	<b>3,9</b>	<b>1,5</b>
<b>Hiszton H4 család</b>	<b>4</b>	<b>1,1</b>

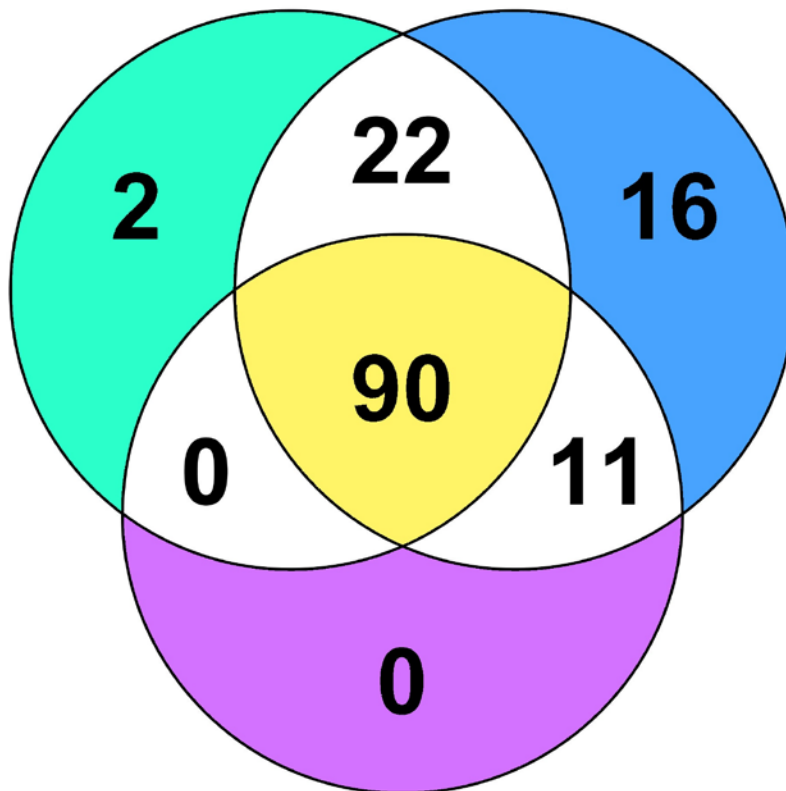
#### **IV. 3. 3. Biológiai és technikai reprodukálás**

A fenti eredmények 3 biológiai és 3 technikai reprodukálásból származtak. Mind a mikrovezikulumok mind pedig az apoptotikus testek esetén a technikai és a biológiai replikátumokból kapott eredmények (fehérjelisták) nagyon hasonlóak. Mind a technikai, mind pedig a biológiai reprodukálás nemzetközi összehasonlításban kiválóan számít. A gyakorlati szempontból fontosabb biológiai reprodukálás során mikrovezikulumokban a

fehérjék 72%-át, apoptotikus testekben pedig a fehérjék 64%-át észleltem mindhárom esetben. A fehérjék további 20% ill 23%-át 2 mintában azonosítottuk, a fehérjék mindössze ca. 10%-a jelent meg csak egy minta esetén. A 8 A és B ábrán látható a 3 biológiai reprodukálás során azonosított fehérjék száma Venn-diagramm formájában mikrovezikulumok és apoptotikus testek esetén.



**8. A ábra Thymus eredetű mikrovezikulumokban azonosított fehérjék 3 biológiai reprodukálás esetén**



**8. B ábra** Thymus eredetű apoptotikus testekben azonosított fehérjék 3 biológiai reprodukálás esetén

## V. MEGBESZÉLÉS

Kutatómunkám során a fehérjék vizsgálatára ESI ionforrással rendelkező Q-TOF Premier tömegspektrométert használtam. Mivel a munkám során elsősorban fehérje keverékeket vizsgáltam, a minta ionforrásba juttatása nanoUPLC-n keresztül történt, mellyel az elválasztás hatékonysága és az érzékenység jelentősen növelhető. Mintáim vizsgálatához az ESI ionforrást választottam, a folyadékkromatográfhoz történő on-line kapcsolás miatt, mivel komplex minták vizsgálata esetén a minta komponenseinek szétválasztása nélkülözhetetlen. A fehérjék azonosítását a „bottom up” eljárással végeztem.

Ahhoz, hogy a thymus eredetű mikrovezikulumok és apoptotikus testek fehérjéit vizsgálhassam, számos gyakorlati problémát kellett megoldanom. Ezeket a következőkben tárgyalom.

### V. 1. Extracelluláris vezikulumok feltárása

Mivel az extracelluláris vezikulumok tömegspektrometriai vizsgálatával kapcsolatos irodalom a vezikulumok feltárásának módszerét kevésbé tárgyalja, munkám első lépése a vezikulumok a későbbi nanoUPLC-MS(MS) mérést nem zavaró feltárásának megoldása volt.

A vezikulumok membránjának felnyitására és a fehérjék kiszabadítására különböző módszereket vettem össze. A módszerfejlesztés során három módszert alkalmaztam. Az egyes módszereknek eltérő a munkaigényük. Az első esetben az extracelluláris vezikulum frakciót különböző felületaktív anyagok hatásának tettem ki. Ezen kívül elvégeztem a minták közvetlen SDS poliakrilamid gélelektroforézisét követő gélben történő emésztését is, mivel az irodalom elsősorban ezt a módszert használja. Az utolsó esetben a vezikula frakciót fagyasztás-olvasztás ciklusoknak tettem ki [92, 93]. A mintaelőkészítés módja megszabta a tripszines emésztés módját is; az első és utolsó esetben oldatban, míg a gélelektroforézis esetén gélben történt az emésztés.

### V. 1. 1. Az egyes feltérési módszerek előnyei, hátrányai

Felületaktív anyag alkalmazása esetén a mintaelőkészítés viszonylag kevés, 13 lépésből állt. A felületaktív anyagok azonban elnyomták a jelet a tömeg spektrumban a ZipTip-es tisztítás és sómentesítés ellenére és nem azonosítottam a mintában fehérjét. A minta közvetlen SDS poliakrilamid gélen történő futtatása és emésztése segítségével néhány fehérjét azonosítottam; a mintaelőkészítés azonban igen hosszadalmas, 46 lépésből áll (2 nap). A fagyasztás-olvasztásos módszer alkalmazásával tudtam elérni ennél rövidebb idejű és megfelelő mintafeltérést. A fagyasztás-olvasztás eljárás során az öt ciklus folyékony nitrogént (30 s) és a két ciklus -20 °C-on (1 óra) történő fagyasztást tartalmazó módszert találtam a legjobbnak. A mintaelőkészítés lényegesen rövidebb a gélelektroforézisnél (19 lépés szemben a 46 lépéssel). A fő előny azonban az, hogy a fagyasztás-olvasztás eljárással körülbelül négyszer több fehérjét azonosítottam a mintából (9. táblázat). A fagyasztás-olvasztás eljárással egy gyors, egyszerű és hatékony módszert dolgoztam ki a fehérjék feltérására az extracelluláris vezikulumokból.

#### 9. táblázat Vezikulumok feltérására alkalmazott módszerek összehasonlítása

Módszer	Mintaelőkészítés	Azonosított fehérjék száma
Felületaktív anyag	13 lépés	0
1D SDS-PAGE	46 lépés	8
Fagyasztás-olvasztás	19 lépés	35



## **V. 2. „Mini” protokoll kis mennyiségű fehérje keverékek emésztésére**

A proteomikai vizsgálatok egyik kulcslépése a minta fehérjéinek emésztése. Ez standard fehérjék, illetve fehérjéket nagyobb mennyiségben tartalmazó biológiai minták esetén rutinszerű. Az emésztés történhet oldatban vagy gélben. Mindkét módszernek vannak előnyei, munkám során azonban az oldatban történő emésztés optimalizálását tűztem ki célul, mely alkalmasabb nagy áteresztőképességű vizsgálatok esetén.

Az irodalomban számos protokoll található az oldatban történő tripszines emésztésre. Fontos, hogy a protokollok, melyeket használunk, robusztusak legyenek, hiszen igazolták, hogy a protokoll akár kis módosítása is jelentős hatással lehet a keverékek fehérjéinek meghatározására [97]. Az inkubációs idő 18 órától 1 órára csökkentését például kedvezőnek találták [100], feltehetően a nem-specifikus hasítások csökkenése miatt. Egyéb módosítások közé tartozik a sav hatására elbomló felületaktív anyagok alkalmazása [98], amelyek elsősorban a tömegspektrometria szempontjából előnyösek. Az emésztés elősegíthető mikrohullám [102, 103, 112], vagy ultrahang [104] alkalmazásával. Leírtak monolit szilikára rögzített immobilizált tripszin [113] használatot és chip-alapú technikát [114] is. Egy nemrég megjelent közlemény a kis mennyiségű fehérje (150 ng) emésztését egy speciális készülékben (thermocycler) javasolja. Az emésztés 5 perc alatt megtörténik [99].

### **V. 2. 1 Kis térfogatban történő emésztés nehézségei**

Kis térfogatú minták emésztése esetén számos olyan tényezőt is figyelembe kell venni, melyek nagy térfogatú minták emésztése esetén nem jelentenek gondot így például a minta párolgása, anyag kitapadása az edényzet falához stb. Esetemben a 15  $\mu$ L mintatérfogat még kezelhető volt, hiszen a reprodukálás és a fehérjeazonosítás hasonló, mint nagy minta térfogatok emésztése esetén.

Ezen szempontok alapján dolgoztam ki egy egyszerű tripszines emésztési protokollt, mely alkalmazható kis mennyiségű fehérje kis térfogatban történő emésztésére (ng nagyságrendű össz-fehérje mennyiség, 15  $\mu$ L térfogatban). A módszer további előnye, hogy hagyományos laborszükszöket igényel és protein keverékek emésztésére is alkalmazható. Az emésztés sikerességét és a mintában azonosított minor

és fő fehérje komponenseket nanoUPLC-MS(MS)-sel vizsgáltam. Az eredményeket az irodalomban szereplő nagy térfogatú emésztési protokollok eredményeivel vettem össze.

## V. 2. 2 Választott minta

A protokoll kidolgozásához hígított vérplazmát választottam, mely egy fő komponenssel (albumin) és számos jól ismert, kisebb mennyiségű komponenssel rendelkezik. Céлом nem a plazma komponenseinek vizsgálata, hanem a módszerfejlesztés volt. Kiindulási mintamennyiségként 10  $\mu$ L hígított plazmát használtam, ami körülbelül 3 pmol (200 ng) albumint és 0,3 pmol össz mennyiségben egyéb minor komponenseket tartalmaz. Ehhez a mintához 2 pmol BLG belső standardot adtam, mely számos egyedi peptidfragmensekkel rendelkezik. A belső standard alkalmazásának két előnye van: elsősorban lehetővé teszi a fél-kvantitatív becslést, másrészt segíthet a minta fehérjéinek különböző felületekre történő kitapadásának csökkentésében. Ez különösen kis mennyiségű ismeretlen minták (fmol tartomány) esetén kritikus. Ilyen esetben, a nagyobb mennyiségben jelenlevő belső standard (pl. BLG) fehérje segíthet a mintavesztés csökkentésében a kompetitív adszorpció révén.

Az emésztett fehérjekeveréket nanoUPLC-MS(MS) módszerrel vizsgáltam, a III. 4 fejezetben ismertetett módon. A minta fehérjéit és az emésztés melléktermékeit (pl. kihagyott hasítás) tandem tömegspektrometriával azonosítottam. A kvantitatív becsléseket a külön HPLC futásból származó, normál MS üzemmódban észlelt különböző jelintenzitások összehasonlításával végeztem. Az eredményeket a jelintenzitások és azonosított fehérjék száma alapján értékeltem ki. Az emésztést követően nyert mintából (15  $\mu$ L végtérfogat) 2  $\mu$ L-t injektáltam a nanoUPLC-MS(MS) rendszerre.

### **V. 2. 3 Reagensek mennyiségének optimalálása**

A kezdeti módszerfejlesztés során változtattam a minta és a reagensek, így a RapiGest, DTT és jódcetamid mennyiségét. Mivel azt tapasztaltam, hogy a nagy mennyiségben alkalmazott RapiGest hátrányos a minor fehérjék azonosítása tekintetében, 5-10-szeresére csökkentettem mennyiségét az irodalmi protokollokhoz [98, 109, 110] képest. A jódcetamid és DTT mennyiségének változtatása nem befolyásolta jelentősen a kapott eredményeket. Az el nem reagált jódcetamid jelenléte miatt minimális O-alkilezés megfigyelhető volt a Mini protokoll esetén, ez azonban nem hátráltatta a fehérjék azonosítását. A kezdeti optimalálási lépések után a tripszin mennyiségének (1:2,5, 1:5, 1:20 enzim: fehérje arány) és az inkubációs időnek (90 és 180 perc) az emésztésre gyakorolt hatását vizsgáltam. A kiértékelés során a következőket ellenőriztem: azonosított fehérjék száma, kihagyott és nem-specifikus hasítás aránya és tripszin önemésztési fragmensek mennyisége. Az eredmények arra engedtek következtetni, hogy a magasabb tripszin: minta arány előnyösebb, különösképp a kis fehérjék azonosítása szempontjából, ezért a végső protokollban 1:2,5 arányt használtam. A minta túlzott hígulásának elkerülése érdekében csak kis térfogatban adtam a reagenseket a mintához. A reprodukálhatóság növelése érdekében az 1  $\mu$ L-nél kisebb folyadék mennyiségek hozzáadását elkerültem és reagens keverékeket adtam a mintához.

### **V. 2. 4 Nagy tripszin : fehérje arány hatásai**

A kidolgozott „Mini” protokoll az általánosan javasoltnál nagyobb tripszin: fehérje arányt alkalmaz. A kezdeti módszerfejlesztés arra engedett következtetni, hogy ez a kis mennyiségben található fehérjék azonosítását elősegíti. Annak igazolására, hogy a nagyobb tripszin: fehérje arány alkalmazása nem jár kedvezőtlen hatásokkal, megvizsgáltam számos tényezőt, mely erre hatással lehet. Tripszin önemésztési fragmenseket azonosítottam a mintában, melyek mennyisége növekedett a tripszin mennyiségével és az emésztés idejének előrehaladtával. Ezen fragmensek intenzitása azonban a legmagasabb tripszin: fehérje arány (1:2,5, mint a Mini protokoll esetén) és leghosszabb emésztés (3 óra) esetén sem közelítette meg az albumin fragmenseinek intenzitását; mennyiségük a minor fehérje komponensekhez hasonlított; és jelenlétük

nem akadályozta a plazmafehérjék azonosítását. Ilyen körülmények között egyetlen nem-specifikus hasítást azonosítottam, mely fragmens az albuminhoz tartozott, és szintén nem hátráltatta a vizsgálatot. Ezzel szemben kihagyott hasítások (olyan szekvenciák melyben a proteáznak hasítania kellene, de nem hasít) gyakran előfordultak. Az adatbázisokban történő keresések során egy szekvencia szakaszon belül egy kihagyott hasítási helyet engedélyeztem. A „Mini” protokoll esetén ezen kihagyott hasítások kis mennyiségben voltak jelen, mennyiségük azonban növekedett a tripszin mennyiségének csökkentésével az általánosan használt 1:20 és 1:50 arányra. Három kiválasztott normál hasítású és a megfelelő kihagyott hasítást is tartalmazó peptid pár esetén összehasonlítottuk az intenzitásokat. Minden pár esetén ezek összegét tekintettük 100%-nak. Ez alapján következtetni tudtam a kihagyott hasítások gyakoriságára. A triptikus fragmensekhez viszonyítva a kihagyott hasítások átlagosan 10%-ban voltak megfigyelhetőek a Mini protokoll esetében, mely arány 2%-ra csökkent az inkubációs idő 3 órára történő növelésével. A tripszin mennyiségének 1:20 arányra csökkentésekor a kihagyott hasítások nagyobb százalékban voltak jelen; másfél óra emésztés során 25%-ban, míg 3 óra esetén 15%-ban. Úgy tűnik, hogy alacsonyabb tripszin: fehérje arány esetén az emésztés nem valósul meg néhány óra alatt. A kidolgozott protokoll hatékonyságának ellenőrzésére az azonosított fehérjék számának összehasonlítása a legkézenfekvőbb. A Mini protokollt használva, de a tripszin mennyiségét csökkentve 1:2,5, 1:5 és 1:20 arányra az azonosított fehérjék száma (a „laza” követelményt használva) a következőképpen csökkent: 20, 18 és 15. Az emésztés idejének 3 órára történő növelése nem volt jelentős hatással az azonosított fehérjék számára. Hosszabb, pl. éjszakán át tartó emésztés vagy mikrohullámú besugárzás esetén az optimális tripszin mennyiség feltételezhetően csökkenthető, munkám során ezek optimalizálásával nem foglalkoztam.

Szeretném hangsúlyozni, hogy a kidolgozott protokollal nem a jobb eredmények elérése volt a célom, hanem az, hogy olyan protokollt találjak, mely működik kis mintamennyiség kis térfogatú emésztése esetén. Habár a protokoll kidolgozása tripszin emésztőenzim alkalmazásával történt, valószínűsíthető, hogy a koncepció más emésztőenzimek például Glu-C esetén is működne. Ilyen esetekben (miként a tripszines protokoll esetén) a felhasznált reagensek térfogatának minimalizálására kell törekedni;

relatív magas enzim: analit arányt szükséges használni és a minta teljes bepárlása elkerülendő.

### **V. 3. Thymus eredetű mikrovezikulumokban és apoptotikus testekben azonosított fehérjék jelentősége**

A thymus (csecsemőmirigy) egy központi immun szerv, melyben a T-limfocita-előalakok előbb a pozitív majd a negatív szelekción esnek át. A thymus tehát a sejtes immunválaszért felelős T-limfociták termelődésének és érésének legfőbb helyszíne, így a szervezet ellenálló rendszerének legfontosabb központi szerve. Jelentősen hozzájárul a védekező sejtes immunválasz kialakulásához és egyidejűleg megakadályozza a patológiás autoimmunitást. Egyik fontos tulajdonsága az antigének sokaságának ektópikus génexpressziója.

Vizsgálataim középpontjában a thymus által szekretált két vezikulum populáció proteomikai vizsgálata állt, melyek az irodalomban meglepő módon kevésbé jellemzettek az exoszómáknál. A T-limfociták érése során a saját epitópok bemutatása kulcsfontosságú. Elsősorban az érdekelt, hogy a thymus eredetű apoptotikus testek és mikrovezikulumok szerepet játszanak-e a szöveti antigének terjesztésében és ezáltal szerepet játszanak-e a szelekciós folyamatokban. Habár tömegspektrometria segítségével nem mutattam ki a mintákban ektópikusan expresszált szöveti fehérjéket, ez nem zárja ki jelenlétüket a vezikulumokban a tömegspektrometria kimutatási határánál alacsonyabb mennyiségben. Számos olyan fehérjét azonosítottam, melyek segítségével ezen szubcelluláris struktúrák thymusban betöltött szabályozó szerepével kapcsolatos új információkhoz juthatunk.

#### **V. 3. 1 A preparátum lehetséges szennyezései**

Az együttműködő partnereink egy nemrég megjelent közleményükben igazolták, hogy a mikrovezikulumok a fehérje komplexekkel azonos biofizikai paraméterekkel rendelkeznek [37]. Éppen ezért nemcsak a mikrovezikulumok detektálásakor zavarhatnak a fehérje aggregátumok, hanem a mikrovezikulum preparátumokat szennyezhetik is a fehérje komplexek [37]. Fontos ezért az izolált mikrovezikulumok proteomikai adatainak kellő körültekintéssel való kezelése. A jelen munka során thymocyták

szérummentes szövettenyészteti felülúszóját vizsgáltam. A nem vezikula eredetű szennyező fehérje aggregátumok jelenlétét az együttműködő partnerek 0,05% Triton X-100-zal történő lízis alapján áramlási citométerrel történő detektálás alapján kizárták, hiszen a vezikulum preparátum minden struktúrája eltűnt.

### **V. 3. 2 Azonosított fehérjék jelentősége**

A találati listában szereplő fehérjék közül azokat fogadtam el, melyekhez legalább két peptidfragmenst azonosítottam és a minimum Mascot pontszám egy biztos találatnak felelt meg ( $p < 0,01$ ). Ilyen feltételekkel az egér thymus sejtekből származó apoptotikus testekben 142, míg a mikrovezikulumokban 195 fehérjét azonosítottam. A fehérjék többségét (citoszkeletális fehérjék, citoszkeletális kötőfehérjék, metabolikus enzimek stb.) már különböző eredetű exoszómákban [22, 23, 115] is azonosították; úgy tűnik tehát, hogy a különféle típusú vezikulum populációk azonos fehérjékkel is rendelkeznek.

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 arthritthis és egyéb autoimmun betegségek patomechanizmusában [116-118]. Sikerült továbbá hősokk fehérjéket is azonosítanom, melyek feltételezhetően atherosclerosisban játszanak szerepet, mint autoantigének [119, 120]. Mindkét vezikulum populációban detektáltam hisztonokat (H1-H4). A hisztonok a nukleoszóma fő alkotói, melyeket elsődleges autoantigén célpontnak tekintenek a szisztémás lupus erythematosus-ban (SLE) [121]. Ezen autoantigének jelenléte a thymus eredetű apoptotikus testekben és mikrovezikulumokban rendkívül érdekes, hiszen a patológias autoimmunitás kialakulásának hátterében a centrális tolerancia autoantigének iránti megváltozása áll.

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 nagy része apoptózis során képződik.

A vizsgálat másik érdekes eredménye a vezikulumokban kulcsfontosságú szabályozó és jelző molekulák, mint például az elongációs factor 2 (EF2) azonosítása. Az EF2 a transzkripciós faktorok egyik csoportját képezi; feladatai közé tartozik a sejtciklus szabályozása, az emlős sejtekben a DNS szintézise, tumorigenezis, apoptózis és differenciáció [122]. 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. A galectin-1 feltételezhetőleg szerepet játszik az apoptózis indukálásában és a T-sejt pusztulás szabályozásában [123, 124]. Munkám során kimutattam a galectin-1 fehérjét a thymus eredetű mikrovezikulumokban tömegspektrometria segítségével. Ezt az eredményt az együttműködő partnereink Western Blot segítségével is igazolták. Ez alátámasztja az extracelluláris vezikulumoknak a thymus működésének szabályozásban betöltött szerepét.

Kimutattam a thymus eredetű mikrovezikulumokban egy kalcium-kötő fehérjét a kalmodulint is, melyről szintén igazolták, hogy különböző sejtes funkciókat szabályoz, így például a limfociták aktiválódását és érését is [125].

Az apoptózissal összefüggő extracelluláris vezikulum képződés a thymusban várhatóan nagy mennyiségben fordul elő, különösképp, ha figyelembe vesszük a thymusra jellemző rendkívül nagy apoptózis arányt [105]. Ezért feltételezhetően ezen szubcelluláris szerkezetek a thymus környezetében jelentős moduláló hatások közvetítésében játszhatnak szerepet.

Számos immunrendszerben kulcsfontosságú molekula jelenlétét azonosítottuk a vezikulumokban, így például az MHCI és MHCII molekulákat, valamint CD5 és CD97 (mikrovezikulumokban), továbbá mindkét vezikulum típusban a CD45 molekulát. Az adatok arra utalnak, hogy létezik kétirányú extracelluláris vezikulumok által közvetített párbeszéd az érő T-sejtek és az antigénprezentáló thymus sejtek között.

## VI. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatómunkám során folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás módszert alkalmaztam thymus eredetű membrán vezikulumok fehérjéinek meghatározására. A vezikulumok sikeres analitikájához nélkülözhetetlen módszereket, protokollokat dolgoztam ki. Legfontosabb eredményeim és az ezekből levonható következtetések az alábbiakban foglalhatók össze:

1. Megoldottam vezikulumok feltárását, mely a később alkalmazandó nanoUPLC-MS analitikát nem zavarja és számos előnnyel rendelkezik a szokásos gélelektroforézishez képest. A módszer fagyasztás-olvasztás ciklusok alkalmazásán alapul, alkalmazásával körülbelül négyszer több fehérjét azonosítottam a vezikulum mintákban, mint gélelektroforézissel.
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 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 „jelvés nélküli” kvantifikálással. Az azonosított hisztonokat hiszton-családokba soroltam és ezek mennyiségét szintén meghatároztam. Megállapítottam, hogy a vizsgált esetben mindkét típusú vezikulum főleg apoptózis során képződik.

## VII. 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.

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. A protokoll könnyen kivitelezhető, továbbá nem igényel különleges laboreszközöket. 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 fehérjéinek meghatározására alkalmaztam. Az apoptotikus testekben 142, mikrovezikulumokban pedig 195 fehérjét azonosítottam. Ezen fehérjék között megfigyelhetőek voltak többek között autoantigének és kulcsfontosságú szabályozó és jelzőmolekulák.

## VIII. SUMMARY

In my PhD work, in collaboration with the Department of Genetics, Cell- and Immunobiology of the Semmelweis University, I have determined the protein composition of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies using a nanoLC-MS/MS technique. The presence and abundance of proteins with high immunological relevance within thymocyte-derived apoptotic bodies and microvesicles suggest that these subcellular structures may substantially modulate T-cell maturation processes within the thymus.

In order to achieve these results, I had to solve a number of analytical problems related to the analysis of minute amounts of protein mixtures; such as those present in extracellular vesicles. I have developed a method for extracting the protein content of extracellular vesicles; which does not interfere with LC-MS analysis. The method is based on freeze-thaw cycles and using this method I have identified four times more proteins than with gel electrophoresis used in the literature. Next, I have developed a miniaturized tryptic digestion protocol. The protocol works well for small amounts of proteins using a small volume of reagents and is capable of detecting minor proteins present in complex biological mixtures. The developed miniaturized digestion protocol proved to be robust and well suited for mass spectrometry based proteomic applications. The developed workflow has been applied for the determination of proteins present in mouse thymocyte-derived extracellular vesicles. The developed workflow has been applied for the determination of proteins present in mouse thymocyte-derived extracellular vesicles. I have identified 142 and 195 proteins respectively, in apoptotic bodies and microvesicles. Among these I could detect autoantigens and important regulatory and signaling molecules.

## IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. Fonyó A. Az orvosi élettan tankönyve. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2011
2. Thery C, Ostrowski M, and Segura E. (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9: 581-593.
3. Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, Laszlo V, Pallinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, and Buzas EI. (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*, 68: 2667-2688.
4. Aupeix K, Hugel B, Martin T, Bischoff P, Lill H, Pasquali JL, and Freyssinet JM. (1997) The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest*, 99: 1546-1554.
5. Lee TH, D'Asti E, Magnus N, Al-Nedawi K, Meehan B, and Rak J. (2011) Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer-the emerging science of cellular 'debris'. *Semin Immunopathol*, 33: 455-467.
6. Zwicker JJ, Liebman HA, Neuberger D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, and Furie B. (2009) Tumor-Derived Tissue Factor-Bearing Microparticles Are Associated With Venous Thromboembolic Events in Malignancy. *Clin Cancer Res*, 15: 6830-6840.
7. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, and Rak J. (2008) Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*, 10: 619-624.
8. Taylor DD, and Gercel-Taylor C. (2008) MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 110: 13-21.
9. Escudier B, Dorval T, Chaput N, Andre F, Caby MP, Novault S, Flament C, Leboulleire C, Borg C, Amigorena S, Boccaccio C, Bonnerot C, Dhellin O, Movassagh M, Piperno S, Robert C, Serra V, Valente N, Le Pecq JB, Spatz A, Lantz O, Tursz T, Angevin E, and Zitvogel L. (2005) Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med*, 3: 10-23.

10. Morse MA, Garst J, Osada T, Khan S, Hobeika A, Clay TM, Valente N, Shreeniwas R, Sutton MA, Delcayre A, Hsu DH, Le Pecq JB, and Lysterly HK. (2005) A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med*, 3: 9-17.
11. Dai S, Wei D, Wu Z, Zhou X, Wei X, Huang H, and Li G. (2008) Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol Ther*, 16: 782-790.
12. Alvarez-Erviti L, Seow YQ, Yin HF, Betts C, Lakhali S, and Wood MJA. (2011) Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol*, 29: 341-345.
13. Thery C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, and Amigorena S. (2001) Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: A secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*, 166: 7309-7318.
14. Hawari FI, Rouhani FN, Cui XL, Yu ZX, Buckley C, Kaler M, and Levine SJ. (2004) Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: A mechanism for generation of soluble cytokine receptors. *P Natl Acad Sci USA*, 101: 1297-1302.
15. Marzesco AM, Wilsch-Brauninger M, Dubreuil V, Janich P, Langenfeld K, Thiele C, Huttner WB, and Corbeil D. (2009) Release of extracellular membrane vesicles from microvilli of epithelial cells is enhanced by depleting membrane cholesterol. *Febs Lett*, 583: 897-902.
16. Trams EG, Lauter CJ, Salem N, and Heine U. (1981) Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 645: 63-70.
17. Harding C, Heuser J, and Stahl P. (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*, 97: 329-339.
18. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, and Johnstone RM. (1985) Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*, 101: 942-948.
19. Esser J, Gehrman U, D'Alexandri FL, Hidalgo-Estevez AM, Wheelock CE, Scheynius A, Gabrielsson S, and Radmark O. (2010) Exosomes from human

- macrophages and dendritic cells contain enzymes for leukotriene biosynthesis and promote granulocyte migration. *J Allergy Clin Immunol*, 126: 1032-1040.
20. Blanchard N, Lankar D, Faure F, Regnault A, Dumont C, Raposo G, and Hivroz C. (2002) TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol*, 168: 3235-3241.
  21. Admyre C, Bohle B, Johansson S, Focke-Tejkl M, Valenta R, Scheynius A, and Gabrielsson S. (2007) B-cell derived exosomes can present allergen-derived peptides and activate allergen-specific T-cells to proliferate and produce TH2-like cytokines. *J Allergy Clin Immunol*, 120: 1418-1424.
  22. Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PTM, Schwarzmann G, Mobius W, Hoernschemeyer J, Slot JW, Geuze HJ, and Stoorvogel W. (2003) Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes - Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem*, 278: 10963-10972.
  23. Hegmans J, Bard MPL, Hemmes A, Luider TM, Kleijmeer MJ, Prins JB, Zitvogel L, Burgers SA, Hoogsteden HC, and Lambrecht BN. (2004) Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *Am J Pathol*, 164: 1807-1815.
  24. Bard MP, Hegmans JP, Hemmes A, Luider TM, Willemsen R, Severijnen LAA, van Meerbeeck JP, Burgers SA, Hoogsteden HC, and Lambrecht BN. (2004) Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am J Resp Cell Mol*, 31: 114-121.
  25. Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, and Bonnerot C. (2005) Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*, 17: 879-887.
  26. Raj DA, Fiume I, Capasso G, and Pocsfalvi G. (2012) A multiplex quantitative proteomics strategy for protein biomarker studies in urinary exosomes. *Kidney Int*, doi: 10.1038/ki.2012.25.
  27. Skriner K, Adolph K, Jungblut PR, and Burmester GR. (2006) Association of citrullinated proteins with synovial exosomes. *Athritthis Rheum-US*, 54: 3809-3814.

28. Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, Filen JJ, Lahesmaa R, Norman M, Neve EPA, Scheynius A, and Gabrielsson S. (2007) Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol*, 179: 1969-1978.
29. Mathivanan S, Lim JWE, Tauro BJ, Ji H, Moritz RL, and Simpson RJ. (2010) Proteomics Analysis of A33 Immunoaffinity-purified Exosomes Released from the Human Colon Tumor Cell Line LIM1215 Reveals a Tissue-specific Protein Signature. *Mol Cell Proteomics*, 9: 197-208.
30. Chaput N, and Thery C. (2010) Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol*, 33: 419-440.
31. Mathivanan S, Ji H, and Simpson RJ. (2010) Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*, 73: 1907-1920.
32. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, and Raposo G. (2004) Cells release prions in association with exosomes. *P Natl Acad Sci USA*, 101: 9683-9688.
33. Kramer B, Pelchen-Matthews A, Deneka M, Garcia E, Piguet V, and Marsh M. (2005) HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells. *Blood Cell Mol Dis*, 35: 136-142.
34. Sherer NM, Lehmann MJ, Jimenez-Soto LF, Ingmundson A, Horner SM, Cicchetti G, Allen PG, Pypaert M, Cunningham JM, and Mothes W. (2003) Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic*, 4: 785-801.
35. Chargaff E, and West R. (1946) The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem*, 166: 189-197.
36. Wolf P. (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*, 13: 269-288.
37. Gyorgy B, Modos K, Pallinger E, Paloczi K, Pasztoi M, Misjak P, Deli MA, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgar A, Toth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel A, and Buzas EI. (2011) Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood*, 117: E39-E48.

38. Smalley DM, Sheman NE, Nelson K, and Theodorescu D. (2008) Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *J Proteome Res*, 7: 2088-2096.
39. Cocucci E, Racchetti G, and Meldolesi J. (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*, 19: 43-51.
40. Leroyer AS, Tedgui A, and Boulanger CM. (2008) Role of microparticles in atherothrombosis. *J Intern Med*, 263: 528-537.
41. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, and Surprenant A. (2001) Rapid secretion of interleukin-1 beta by microvesicle shedding. *Immunity*, 15: 825-835.
42. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GFM, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, and Lee DM. (2010) Platelets Amplify Inflammation in Arthritis via Collagen-Dependent Microparticle Production. *Science*, 327: 580-583.
43. Giusti I, D'Ascenzo S, Millimaggi D, Taraboletti G, Carta G, Franceschini N, Pavan A, and Dolo V. (2008) Cathepsin B mediates the pH-dependent proinvasive activity of tumor-shed microvesicles. *Neoplasia*, 10: 481-488.
44. Antonyak MA, Li B, Boroughs LK, Johnson JL, Druso JE, Bryant KL, Holowka DA, and Cerione RA. (2011) Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *P Natl Acad Sci USA*, 108: 4852-4857.
45. Pap E, Pallinger E, Falus A, Kiss AA, Kittel A, Kovacs P, and Buzas EI. (2008) T lymphocytes are targets for platelet- and trophoblast-derived microvesicles during pregnancy. *Placenta*, 29: 826-832.
46. Connor DE, Exner T, Ma DDF, and Joseph JE. (2010) The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemostasis*, 103: 1044-1052.
47. Yuana Y, Bertina RM, and Osanto S. (2011) Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb Haemostasis*, 105: 396-408.



48. Kerr J, Wyllie A, and Currie A. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257.
49. Hristov M, Erl W, Linder S, and Weber PC. (2004) Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*, 104: 2761-2766.
50. Beyer C, and Pisetsky DS. (2010) The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 6: 21-29.
51. Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, Spetz AL, and Holmgren L. (2001) Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *P Natl Acad Sci USA*, 98: 6407-6411.
52. Holmgren L, Bergsmedh A, and Spetz AL. (2002) Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Vox Sang*, 83: 305-306.
53. Cocca BA, Cline AM, and Radic MZ. (2002) Blebs and apoptotic bodies are B cell autoantigens. *J Immunol*, 169: 159-166.
54. Savill J, Dransfield I, Gregory C, and Haslett C. (2002) A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2: 965-975.
55. Dey-Hazra E, Hertel B, Kirsch T, Woywodt A, Lovric S, Haller H, Haubitz M, and Erdbruegger U. (2010) Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vasc Health Risk Manag*, 6: 1125-1133.
56. They C, Amigorena S, Raposo G, and A C. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 3: Unit 3.22.
57. Dignat-George F, Freyssinet JM, and Key NS. (2009) Centrifugation is a crucial step impacting microparticle measurement. *Platelets*, 20: 225-226.
58. Rubin O, Crettaz D, Tissot JD, and Lion N. (2010) Pre-analytical and methodological challenges in red blood cell microparticle proteomics. *Talanta*, 82: 1-8.

59. Chen C, Skog J, Hsu CH, Lessard RT, Balaj L, Wurdinger T, Carter BS, Breakefield XO, Toner M, and Irimia D. (2010) Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab Chip*, 10: 505-511.
60. Dale GL, Remenyi G, and Friese P. (2005) Quantitation of microparticles released from coated-platelets. *J Thromb Haemost*, 3: 2081-2088.
61. Turiak L, Misjak P, Szabo TG, Aradi B, Paloczi K, Ozohanics O, Drahos L, Kittel A, Falus A, Buzas EI, and Vekey K. (2011) Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *J Proteomics*, 74: 2025-2033.
62. van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, and Nieuwland R. (2010) Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost*, 8: 2596-2607.
63. Yuana Y, Oosterkamp TH, Bahatyrova S, Ashcroft B, Rodriguez PG, Bertina RM, and Osanto S. (2010) Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J Thromb Haemost*, 8: 315-323.
64. Siedlecki CA, Wang IW, Higashi JM, Kottke-Marchant K, and Marchant RE. (1999) Platelet-derived microparticles on synthetic surfaces observed by atomic force microscopy and fluorescence microscopy. *Biomaterials*, 20: 1521-1529.
65. Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, Sampol J, and Dignat-George F. (2009) Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost*, 7: 190-197.
66. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Kasthuri RS, Key NS, Dignat-George F, and Workshop IS. (2010) Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost*, 8: 2571-2574.
67. Bernimoulin M, Waters EK, Foy M, Steele BM, Sullivan M, Falet H, Walsh MT, Barteneva N, Geng JG, Hartwig JH, Maguire PB, and Wagner DD. (2009) Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *J Thromb Haemost*, 7: 1019-1028.

68. Nomura S, Shouzu A, Taomoto K, Togane Y, Goto S, Ozaki Y, Uchiyama S, and Ikeda Y. (2009) Assessment of an ELISA Kit for Platelet-Derived Microparticles by Joint Research at Many Institutes in Japan. *J Atheroscler Thromb*, 16: 878-887.
69. Ay C, Freyssinet JM, Sailer T, Vormittag R, and Pabinger I. (2009) Circulating procoagulant microparticles in patients with venous thromboembolism. *Thromb Res*, 123: 724-726.
70. Hudecz F. (2003) Proteomika- az új kihívás. *LAM*, 13: 216-224.
71. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, and Whitehouse CM. (1989) Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246: 64-71.
72. Plumb R, Castro-Perez J, Granger J, Beattie I, Joncour K, and Wright A. (2004) Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 18: 2331-2337.
73. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, and Yoshida T. (1988) Protein and Polymer Analyses up to  $m/z$  100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2: 151-153.
74. Karas M, Bachmann D, and Hillenkamp F. (1985) Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet-laser desorption mass-spectrometry of organic-molecules *Anal Chem*, 57: 2935-2939.
75. Chait BT. (2006) Mass spectrometry: Bottom-up or top-down? *Science*, 314: 65-66.
76. Aebersold R, and Mann M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422: 198-207.
77. Wehr T. (2006) Top-down versus bottom-up approaches in proteomics. *LC GC N Am*, 24: 1004-1010.
78. Kasicka V. (2001) Recent advances in capillary electrophoresis of peptides. *Electrophoresis*, 22: 4139-4162.
79. Hunt DF, Yates JR, Shabanowitz J, Winston S, and Hauer CR. (1986) Protein sequencing by tandem mass-spectrometry *P Natl Acad Sci USA*, 83: 6233-6237.

80. Mann M, and Wilm M. (1994) Error tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags *Anal Chem*, 66: 4390-4399.
81. Wehr T. (2002) Multidimensional liquid chromatography in proteomic studies. *LC GC N Am*, 20: 954-962.
82. Demeure K, Quinton L, Gabelica V, and De Pauw E. (2007) Rational selection of the optimum MALDI matrix for top-down proteomics by in-source decay. *Anal Chem*, 79: 8678-8685.
83. Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, and Cottrell JS. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20: 3551-3567.
84. Raijmakers R, Berkers CR, de Jong A, Ovaa H, Heck AJR, and Mohammed S. (2008) Automated online sequential isotope labeling for protein quantitation applied to proteasome tissue-specific diversity. *Mol Cell Proteomics*, 7: 1755-1762.
85. Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, and Aebersold R. (2003) A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 75: 4646-4658.
86. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, and Aebersold R. (2002) Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem*, 74: 5383-5392.
87. Elias JE, and Gygi SP. (2010) Target-decoy search strategy for mass spectrometry-based proteomics. *Methods Mol Biol*, 604: 55-71.
88. They C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, and Amigorena S. (1999) Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes: Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol*, 147: 599-610.
89. Mathivanan S, and Simpson RJ. (2009) ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics*, 9: 4997-5000.
90. Garcia BA, Smalley DM, Cho HJ, Shabanowitz J, Ley M, and Hunt DF. (2005) The platelet microparticle proteome. *J Proteome Res*, 4: 1516-1521.

91. Gemmell CH, Sefton MV, and Yeo EL. (1993) Platelet-derived microparticle formation involves glycoprotein-IIb-IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann's thrombasthenia defect *J Biol Chem*, 268: 14586-14589.
92. Josic D, and Clifton JG. (2007) Mammalian plasma membrane proteomics. *Proteomics*, 7: 3010-3029.
93. Chaiyarit S, and Thongboonkerd V. (2009) Comparative analyses of cell disruption methods for mitochondrial isolation in high-throughput proteomics study. *Anal Biochem*, 394: 249-258.
94. Choi DS, Lee JM, Park GW, Lim HW, Bang JY, Kim YK, Kwon KH, Kwon HJ, Kim KP, and Gho YS. (2007) Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer cells. *J Proteome Res*, 6: 4646-4655.
95. Mayr M, Grainger D, Mayr U, Leroyer AS, Leseche G, Sidibe A, Herbin O, Yin XK, Gomes A, Madhu B, Griffiths JR, Xu QB, Tedgui A, and Boulanger CM. (2009) Proteomics, Metabolomics, and Immunomics on Microparticles Derived From Human Atherosclerotic Plaques. *Circ-Cardiovasc Gene*, 2: 379-388.
96. Welton JL, Khanna S, Giles PJ, Brennan P, Brewis IA, Staffurth J, Mason MD, and Clayton A. (2010) Proteomics Analysis of Bladder Cancer Exosomes. *Mol Cell Proteomics*, 9: 1324-1338.
97. Klammer AA, and MacCoss MJ. (2006) Effects of modified digestion schemes on the identification of proteins from complex mixtures. *J Proteome Res*, 5: 695-700.
98. Chen EI, Cociorva D, Norris JL, and Yates JR. (2007) Optimization of mass spectrometry-compatible surfactants for shotgun proteomics. *J Proteome Res*, 6: 2529-2538.
99. Turapov OA, Mukamolova GV, Bottrill AR, and Pangburn MK. (2008) Digestion of native proteins for proteomics using a thermocycler. *Anal Chem*, 80: 6093-6099.
100. Vaezzadeh AR, Deshusses JMP, Waridel P, Francois P, Zimmermann-Ivol CG, Lescuyer P, Schrenzel J, and Hochstrasser DF. (2010) Accelerated digestion for high-throughput proteomics analysis of whole bacterial proteomes. *J Microbiol Meth*, 80: 56-62.

101. Silva JC, Gorenstein MV, Li GZ, Vissers JPC, and Geromanos SJ. (2006) Absolute quantification of proteins by LCMSE - A virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics*, 5: 144-156.
102. Pramanik BN, Mirza UA, Ing YH, Liu YH, Bartner PL, Weber PC, and Bose MK. (2002) Microwave-enhanced enzyme reaction for protein mapping by mass spectrometry: A new approach to protein digestion in minutes. *Protein Sci*, 11: 2676-2687.
103. Sun W, Gao S, Wang L, Chen Y, Wu S, Wang X, Zheng D, and Gao Y. (2006) Microwave-assisted protein preparation and enzymatic digestion in proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 5: 769-776.
104. Lopez-Ferrer D, Heibeck TH, Petritis K, Hixson KK, Qian W, Monroe ME, Mayampurath A, Moore RJ, Belov ME, Camp DG, and Smith RD. (2008) Rapid sample processing for LC-MS-based quantitative proteomics using high intensity focused ultrasound. *J Proteome Res*, 7: 3860-3867.
105. Chao DT, and Korsmeyer SJ. (1997) BCL-X-L-regulated apoptosis in T cell development. *Int Immunol*, 9: 1375-1384.
106. Kyewski B, and Klein L. (2006) A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol*, 24: 571-606.
107. Koble C, and Kyewski B. (2009) The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J Exp Med*, 206: 1505-1513.
108. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, and Mann M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, 68: 850-858.
109. Yu YQ, Gilar M, Lee PJ, Bouvier ESP, and Gebler JC. (2003) Enzyme-friendly, mass spectrometry-compatible surfactant for in-solution enzymatic digestion of proteins. *Anal Chem*, 75: 6023-6028.
110. Imre T, Schlosser G, Pocsfalvi G, Siciliano R, Molnar-Szollosi E, Kremmer T, Malorni A, and Vekey K. (2005) Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 40: 1472-1483.

111. Turiak L, Ozohanics O, Marino F, Drahos L, and Vekey K. (2011) Digestion protocol for small protein amounts for nano-HPLC-MS(MS) analysis. *J Proteomics*, 74: 942-947.
112. Lin S, Wu C, Sun M, Sun C, and Ho Y. (2005) Microwave-assisted enzyme-catalyzed reactions in various solvent systems. *J Am Soc Mass Spectr*, 16: 581-588.
113. Ota S, Miyazaki S, Matsuoka H, Morisato K, Shintani Y, and Nakanishi K. (2007) High-throughput protein digestion by trypsin-immobilized monolithic silica with pipette-tip formula. *J Biochem Bioph Meth*, 70: 57-62.
114. Yang M, Liao J, Jong S, Liao P, Liu C, Wang M, Grunze M, and Tyan Y. (2005) Identification of Human Plasma Proteins by Trypsin Immobilized Digestion Chip and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J Med Biol Eng*, 25: 81-86.
115. Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, Gil D, Matthiesen R, Valle M, Elortza F, Lu SC, Mato JM, and Falcon-Perez JM. (2008) Characterization and Comprehensive Proteome Profiling of Exosomes Secreted by Hepatocytes. *J Proteome Res*, 7: 5157-5166.
116. Goeb V, Thomas-L'Otellier M, Daveau R, Charlionet R, Fardellone P, Le Loet X, Tron F, Gilbert D, and Vittecoq O. (2009) Candidate autoantigens identified by mass spectrometry in early rheumatoid arthritis are chaperones and citrullinated glycolytic enzymes. *Arthritis Res Ther*, 11: R38.
117. Lundberg K, Kinloch A, Fisher BA, Wegner N, Wait R, Charles P, Mikuls TR, and Venables PJ. (2008) Antibodies to Citrullinated alpha-Enolase Peptide 1 Are Specific for Rheumatoid Arthritis and Cross-React With Bacterial Enolase. *Arthritis Rheum-US*, 58: 3009-3019.
118. Lee JH, Cho SB, Bang D, Oh SH, Ahn KJ, Kim J, Park YB, Lee SK, and Lee KH. (2009) Human anti-alpha-enolase antibody in sera from patients with Behcet's disease and rheumatologic disorders. *Clin Exp Rheumatol*, 27: S63-S66.
119. Routsias JG, and Tzioufas AG. (2006) The role of chaperone proteins in Autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*, 1088: 52-64.

120. Businaro R, Profumo E, Tagliani A, Buttari B, Leone S, D'Amati G, Ippoliti F, Leopizzi M, D'Arcangelo D, Capoano R, Fumagalli L, Salvati B, and Rigano R. (2009) Heat-shock protein 90: A novel autoantigen in human carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 207: 74-83.
121. Koutouzov S, Jeronimo AL, Campos H, and Amoura Z. (2004) Nucleosomes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin N Am*, 30: 529-558.
122. Chen HZ, Tsai SY, and Leone G. (2009) Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer*, 9: 785-797.
123. Hernandez JD, Nguyen JT, He JL, Wang W, Ardman B, Green JM, Fukuda M, and Baum LG. (2006) Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death. *J Immunol*, 177: 5328-5336.
124. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, and Baum LG. (1995) Apoptosis of T-cells mediated by galectin-1. *Nature*, 378: 736-739.
125. Krebs J, Wilson A, and Kisielow P. (1997) Calmodulin-dependent protein kinase IV during T-cell development. *Biochem Bioph Res Co*, 241: 383-389.



## **X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE**

### **X. 1. Az értekezés témájában megjelent közlemények**

1. Turiak L, Misjak P, Szabo TG, Aradi B, Paloczi K, Ozohanics O, Drahos L, Kittel A, Falus A, Buzas EI, and Vekey K. (2011) Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *J Proteomics*, 74: 2025-2033.

IF: 5.074

2. Turiak L, Ozohanics O, Marino F, Drahos L, and Vekey K. (2011) Digestion protocol for small protein amounts for nano-HPLC-MS(MS) analysis. *J Proteomics*, 74: 942-947.

IF: 5.074

### **X. 2. Egyéb közlemények jegyzéke**

3. Ozohanics O, Turiak L, Drahos L, and Vekey K. (2012) Comparison of glycopeptide/glycoprotein enrichment techniques. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 26: 215-17.

IF: 2.846

4. Doczi J, Turiák L, Vajda S, Mándi M, Töröcsik B, Gerencser AA, Kiss G, Konràd C, Adam-Vizi V, and Chinopoulos C. (2011) Complex contribution of cyclophilin D to Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition in brain mitochondria, with relation to the bioenergetic state. *J Biol Chem*, 286: 6345-6353.

IF: 5.328

5. Chinopoulos C, Gerencser AA, Mándi M, Mathe K, Töröcsik B, Doczi J, Turiak L, Kiss G, Konràd C, Vajda S, Vereczki V, Oh RJ, and Adam-Vizi V. (2010) 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 J*, 24: 2405-2416.

IF: 6.515

## XI. 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, Újszászy Kálmán, dr. Antony Memboeuf, dr. Budai Lívია, Gömörly 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.