

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**KVANTITATÍV PROTEOMIKAI MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE ÉS ALKALMAZÁSA
KOMPLEX BIOLÓGIAI KÉRDÉSEK TANULMÁNYOZÁSÁRA ÉS POTENCIÁLIS
BIOMARKEREK AZONOSÍTÁSÁRA**

Dr. Csósz Éva



DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN

2020

1. BEVEZETÉS

A biológiai funkciók megértéséhez, a betegségek patomechanizmusának pontosabb megismeréséhez, valamint a diagnosztikai céllal felhasználható marker molekulák azonosításához kiváló lehetőséget biztosítanak a napjainkban egyre szélesebb körben hozzáférhető proteomikai technikák. A kvantitatív proteomika a proteomika azon ága, amely a proteomika eszköztárát felhasználva nem csak a fehérjék jelenlétéről, hanem azok mennyiségéről is szolgáltat információt. A legszélesebb körben használt immunológiai módszerekkel szemben (pl. ELISA) a proteomikai módszerek képesek nagy mennyiségű és nagy pontosságú információt biztosítani a biológiai vagy orvosi kérdések komplex megválaszolására.

A kvantitatív proteomika több módszert használ a fehérjék relatív vagy abszolút kvantitálására. Az abszolút kvantitálás során a fehérje pontos mennyiségét lehet megadni, míg relatív kvantitálással adott fehérjék egyes mintákban mérhető, egymáshoz viszonyított mennyiségi változásai vizsgálhatók. Az immunológiai módszerek általában kis áteresztőképességűek, alkalmazásukkal többnyire egy fehérje abszolút kvantitálására van lehetőség. Létezik olyan immunológiai módszer, amely segítségével egy mintából több, akár 40 fehérje pontos mennyisége is megállapítható (mikrogyöngy-alapú módszerek, pl. Luminex), de ezek költsége általában igen nagy, és a vizsgálható fehérjék limitáltak. A proteomikai módszereket alkalmazó kvantitálás, az esetek igen jelentős részében csak relatív kvantitálást tesz lehetővé, viszont egy analízis során, az alkalmazott módszertől függően, egy mintából több száz fehérje mennyisége vizsgálható. Szemben az immunológiai módszerekkel, ahol előre kiválasztott limitált számú fehérje mennyiségét vizsgáljuk, az ún. „shotgun” tömegspektrometriás módszerek segítségével a mintában levő, elméletileg összes fehérje azonosítása és mennyiségi analízise elvégezhető. Többféle – jelölést alkalmazó, ill. nem alkalmazó – tömegspektrometriás módszer, valamint a kétdimenziós elektroforézis áll rendelkezésre a fehérjék relatív kvantitálására, de a célzott proteomikai módszerek alkalmazásával, akár abszolút kvantitálás is végezhető.

A kétdimenziós elektroforézis két elválasztási módot kombináló komplex módszer. Az első dimenzióban a molekulák a töltésük, míg a második dimenzióban a méretük szerint kerülnek elválasztásra. Az első dimenzió az izoelektromos fókuszálás, amely 3-4% akrilamid tartalmú ún. fókuszáló gélben történik. Különböző amfolitok segítségével egy immobilizált pH gradienst hoznak létre a gélben, majd a gélre felvitt fehérjéket elektromos erőterbe helyezik. Az elektromos erőter hatására a molekulák vándorolni kezdenek, majd abban a pH tartományban, ahol nettó töltésük nulla, és nem hat rájuk sem az anód, sem a katód vonzó hatása, megállnak. Az izoelektromos fókuszálás során fontos, hogy a fehérjék kitékert és oldott állapotban legyenek, ezért speciális puffereket alkalmaznak a fehérjék feloldására és oldatban tartására. A második dimenzióban tulajdonképpen egy méret szerinti elválasztás történik, az esetek legnagyobb részében SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével. A kétdimenziós

gélelektroforézissel elválasztott, és megfelelő festési eljárással láthatóvá/vizsgálhatóvá tett fehérjéket tartalmazó gélek összehasonlítására komplex képanalízis szükséges. A minőségi és mennyiségi analízis révén információ nyerhető pl. egyes organelumok proteómjáról, egy betegségre jellemző proteoformák változásáról, egy adott kezelésre vagy beavatkozásra bekövetkező fehérje szintű változásokról, stb. A kétdimenziós elektroforézis a sok információt adó, átfogó vizsgálatok közé tartozik, amely betekintést ad az adott mintára jellemző fehérjék minőségi és mennyiségi változásaiba. A módszer alkalmas a teljes proteóm vizsgálatára, globális képet nyújt a fehérjékről és a fehérjék poszt-transzlációs módosításáról, viszont nagyon érzékeny, emiatt nagy technikai tudást és nagyon tiszta, ún. elektroforézis minőségű vegyszereket igényel. A kétdimenziós elektroforézis segítségével egyszerre több száz fehérje relatív mennyiségi analízise végezhető el.

A kémiai jelölés során bármilyen biológiai mintát lehet kémiai reakció révén jelölni, de a jelölés hatékonysága sosem 100%-os. Ezzel szemben a jelölés nélküli kvantitálás (label-free quantification) teljes mértékben tömegspektrometriás módszer, amely nem alkalmaz semmiféle jelölő anyagot. A vizsgálat során bekövetkező MS/MS események számát, vagy a prekursor ion intenzitását használják a kvantitáláshoz. Ugyanis minél több MS/MS készül egy fehérjéről vagy minél nagyobb a kiválasztott prekursor ion intenzitása, annál nagyobb koncentrációban van jelen a fehérje a mintában. Mind a jelölés nélküli, mind a kémiai jelölést alkalmazó módszer a nem célzott, „shotgun” módszerek közé tartozik, és jól használható biológiai minták fehérjéinek azonosítására, valamint relatív kvantitálására.

A proteomikai feladatok megoldására a komplex biológiai kérdések megválaszolásánál egyre szélesebb körben elterjedt a célzott proteomika alkalmazása. A kémiai jelölést alkalmazó vagy a jelölés nélküli kvantitálási módszerekkel ellentétben, a célzott módszerek során szükség van a vizsgálandó fehérje ismeretére. A többszörös- vagy szelektív reakció-monitorozáson (Multiple Reaction Monitoring/Selected Reaction Monitoring) alapuló, ún. MRM/SRM módszerek specifikusan képesek detektálni adott molekulákat, és információ nyerhető az illető anyag mennyiségére vonatkozóan is. A módszer elsősorban a hármas kvadrupól analízátorokat tartalmazó tömegspektrométerek sajátossága: azon alapul, hogy az első kvadrupólt úgy állítják be, hogy csak a meghatározott molekulára jellemző m/z aránnyal rendelkező ionokat engedje át, amelyek majd az ütközési cellában fragmentálódnak. A harmadik kvadrupól beállításait úgy módosítják, hogy a keletkezett fragmensek közül csak az előre meghatározott fragmenseket engedje át. Tehát csak akkor lesz jel, ha mindkét, az adott molekulára jellemző feltétel egyidejűleg teljesül. Az ilyen, ún. MRM/SRM átmenetek alkalmazása egyrészt biztosítja a specificitást, másrészt a kromatográfiás csúcs alatti terület arányos a tömegspektrométerbe juttatott molekula mennyiségével. A módszer specificitását, valamint a kvantitálást, ismert mennyiségű, szintetikus, stabil izotóppal jelzett (SIL) peptidok hozzáadásával lehet ellenőrizni. Ez azért lehetséges, mert a mintában levő vizsgálandó peptid és a hozzáadott, szintetikus SIL peptid azonos fiziko-kémiai tulajdonságokkal

rendelkezik: egyszerre eluálódnak, hasonló módon fragmentálódnak, így a szintetikus, SIL peptidek belső standardként használhatók. A módszer óriási előnye, hogy egyszerre több fehérjére jellemző MRM/SRM átmenetek is beilleszthetők egyetlen módszerfájlba, ezáltal több fehérje mennyiségi analízise is elvégezhető egyetlen mintából.

A célzott proteomikai adatok értelmezése viszonylag egyszerű: az egy peptide vagy egy fehérjére jellemző mennyiségi értékeket használják fel a kérdés megválaszolására. Ezzel szemben a nagy adatmennyiséget biztosító jelölést használó vagy jelölés nélküli kvantitálást, vagy kétdimenziós elektroforézist alkalmazó módszerekkel nyert adatok kvalitatív és kvantitatív jellegének együttes felhasználása nehézségekbe ütközik. A hálózatelemzés módszereit gyakran alkalmazzák a biológiailag releváns információk kiderítésére, viszont ezek a hálózatok az esetek igen jelentős részében csak a minőségi adatokat használják, figyelmen kívül hagyva a mennyiségi információt.

A kvantitatív proteomikai technikák és adatfeldolgozási módok jól alkalmazhatók fehérjék vizsgálatára, betegségek patomechanizmusának megértésére, illetve potenciális biomarkerek azonosítására.

A proteomikai technikákat gyakran alkalmazzák fehérjék szerepének vizsgálatára. A PPP foszfatáz család egy új, gombákra jellemző tagja a PPZ1 foszfatáz, amelyet elsőként a *Saccharomyces cerevisiae* modell organizmusban jellemeztek. Ortológjait számos gomba fajban megtalálták. A deléciós mutáns *C. albicans* törzsek vizsgálatával úgy találták, hogy a CaPPZ1 gén által kódolt CaPpz1 enzimnek szerepe van a kation homeosztázis szabályozásában, a sejtfal bioszintézisében, az oxidatív stresszre adott válasz kialakításában, a morfogenezisben, valamint módosíthatja a patogén virulenciáját. Annak ellenére, hogy a deléciós kísérletekkel viszonylag sok információt sikerült gyűjteni a foszfatáz funkciójáról, fiziológiás szubsztátja és a pontos hatásmechanizmusa még megismerésre vár. A proteomikai technikák alkalmazása kiváló lehetőséget biztosít a CaPpz1 szerepének tanulmányozására kvantitatív proteomikai és foszfoproteomikai szinten egyaránt.

A proliferatív vitreoretinopátia (PVR) a rhegmatogén retinaleválást korrigáló műtétek után az esetek 8-25 %-ában kifejlődő komplikáció. A rendelkezésre álló adatok alapján úgy tűnik, hogy tulajdonképpen a retina fiziológiás javítási mechanizmusának kóros folyamata, amely nemkívánatos, sok esetben súlyos látásromlással járó állapotokat okozhat. A PVR-ről viszonylag kevés információ áll rendelkezésre, sajnos etiológiája nem ismert pontosan. Annak ellenére, hogy a patogenezist még homály fedí, számos gyógyszer teszteltek és kezdtek el alkalmazni a PVR terápiájában, de ezek nem mindig bizonyultak hatásosnak. Emiatt nagyon fontos lenne olyan betegség modellek létrehozása, amelyek segítségével jobban meg lehet ismerni a PVR-t okozó elváltozások patomechanizmusát és a potenciális, új terápiás célpontokat.

A biomarkerek olyan molekulák, amelyek jelenlétének, vagy mennyiségi változásainak diagnosztikai szerepe van: előre jelezhetik a betegséget, jelezhetik a betegség meglétét vagy a betegség progresszióját. A proteomikai módszerek fejlődése egyre több lehetőséget biztosít kis mennyiségű biológiai minták fehérjéinek analízisére, így előtérbe került a nem invazív módon gyűjthető biológiai minták, pl. a nyál, verejték, könny diagnosztikai célú analízise.

A megváltozott életforma, táplálkozási szokások és a mozgásszegény életmód bizonyos betegségek pl. hipertónia, kardiovaszkuláris betegségek, cukorbetegség, neurodegeneratív betegségek, tumoros megbetegedések, stb. ugrásszerű emelkedését vonta maga után az elmúlt években. Ezen betegségek esetében közös vonás, hogy háttérükben krónikus gyulladásos folyamatok húzódnak meg. A gyulladásos folyamatok során felszabaduló citokinek antimikrobiális és immunmodulátor peptidek (AMP) családjába tartozó fehérjék termelését segítik elő. Ezek a fehérjék a külvilággal érintkező testfolyadékokban, a könnyben, nyálban, verejtékben, megtalálható kémiai barrier részei, és ezáltal a veszélytett immunrendszer fontos komponensei; részt vesznek az antimikrobiális védekezésben, illetve szabályozzák az immunrendszer működését. Munkám során célom volt a kémiai barrier összetételének vizsgálata könnyben, nyálban és verejtékben, valamint a barrier fehérjék változásainak tanulmányozása olyan betegségekben, mint az Alzheimer kór, a zöldhályog és a szájüregi laphámrák.

Az Alzheimer kór etiológiája nem ismert pontosan, de főként a fejlett országok öregedő lakossága körében egyre gyakoribb az előfordulása, mely jelentős terhet ró a társadalom egészére. Az Alzheimer kór háttérében kimutatták a gyulladásos folyamatok és az oxidatív stressz jelentőségét, ugyanakkor több szemet érintő komplikációt is megfigyeltek. Leírták a fixáció, színlátás és látásélesség zavarát, valamint az amiloid depozitumok jelenlétét a lencsében és a retinában. Ez általában együtt járt a retina ganglion sejtek számának, valamint az axonok számának csökkenésével és az idegsejtek rétegének elvékonyodásával. Különböző, szemet célzó képalkotó eljárások alkalmazásával olyan, nem invazív vizsgálómódszereket próbáltak kifejleszteni, amelyek az Alzheimer kór diagnózisát és/vagy progresszióját a szem vizsgálatával kívánják megállapítani.

A zöldhályog vagy glaukóma – a 40 év feletti populációban – a vakság vezető okai közé tartozik. A betegség patogenezeze nem ismert pontosan; intenzív kutatások több lehetséges okot és útvonalat tártak fel, mint a TGF β szintálút, a glutamát excitotoxicitás, az oxidatív stressz fokozott jelenléte. A normotenzív glaukóma kivételével, a szemnyomás növekedése jellemző a betegségre, de nem kizáró ok vagy tünet, ugyanis olyan állapotokat is leírtak, amikor a zöldhályog normál szemnyomás mellett is kialakul. A betegség prevalenciája a korral növekszik, de az etnikai hovatartozás és az életmód is fontos tényező lehet. A zöldhályogban a látóideg neuropátiája és a retina ganglion sejtjeinek progresszív és irreverzibilis elhalása a látóideg atrofíáját okozza, ami kezeletlenül, akár vaksághoz is vezethet. A terápia során jelenleg az egyetlen befolyásolható tényező a szemnyomás, amelynek csökkentése késleltetheti a betegség

progresszióját és a látás elvesztését. Az általánosan elfogadott protokoll szerint a szemnyomás csökkentésére a szemcseppeket alkalmazzák, de amikor a hatóanyagok kombinációja sem hozza meg a kívánt eredményt, műtéti beavatkozás válik szükségessé. A leggyakrabban alkalmazott műtéti eljárás a trabekulektómia, amely hosszú távú kimenetelét nagymértékben meghatározza a sebgyógyulás. A műtét sikertelenségét okozó komplikációk sokszor a műtét után fél vagy egy évvel jelennek meg. Tekintve, hogy a műtét során több réteg (sclera, trabekuláris hálózat) is sérül, egy komplex sebgyógyulási mechanizmust kell figyelembe venni.

A szájüregi laphámrák (oral squamous cell carcinoma – OSCC) a szájüregi daganatok 90%-át képezi, és az 5 éves túlélés alig több mint 50%. A magas halálozási arány egyik lehetséges oka a betegség késői felismerése, ezért nagy fontosságú az olyan diagnosztikai eljárások kidolgozása, amely lehetővé teszi a korai diagnózis felállítását. Ilyen szempontból nagy jelentősége van a nem invazív módon gyűjthető, folyamatosan termelődő nyál vizsgálatának és olyan nyál biomarkerek azonosításának, amelyek segítségével akár szűrővizsgálatok is végezhetők, és a magas kockázatú csoportok azonosíthatók.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatómunkám során célom volt egy változatos, elsősorban kvantitatív proteomikai technikákat alkalmazó platform fejlesztése, amely a saját kutatási kérdéseim megválaszolásával bizonyítja széleskörű használatosságát az élettudományok területén. A kétdimenziós elektroforézistől, mint számomra ismerős, a PhD tanulmányaim alatt alkalmazott proteomikai technikától kiindulva a bonyolultabb, tömegspektrometriás technikák alkalmazásán keresztül olyan interdiszciplináris kutatásokig kívántam eljutni, amelyek nemcsak létrehozzák, hanem bioinformatikai és hálózatelemző módszerek alkalmazásával értelmezik is a kvantitatív adatokat. A proteomikai technikákat eszközként használva célom volt a minél szélesebb körű biológiailag releváns információ kinyerése a mintákból. Ehhez mind proteomikai, mind adatelemző módszereket kívántam továbbfejleszteni, optimalizálni és alkalmazni.

Célom volt a kutatócsoportom által bevezetett kvantitatív proteomikai technikák segítségével megszerzett tudás transzlációs jellegének növelése, így kutatásaim témájául fontos orvosi vonatkozásokkal bíró kérdéseket választottam. Fő érdeklődési területem a betegségek patomechanizmusának feltárása mellett a diagnosztikus biomarkerek azonosítása nem invazív módon gyűjthető testfolyadékokban. Célom volt olyan kvantitatív proteomikai módszerek kifejlesztése, amelyek segítségével a könnyben, nyálban és verejtékben levő kémiai barrier komponensei vizsgálhatók. A kémiai barrier megváltozásának tanulmányozásával Alzheimer kórban, zöldhályogban illetve szájüregi laphámrákban szenvedő betegek számára diagnosztikus és prognosztikus biomarkereket kívántam azonosítani. Terveztem a szemben zajló sebgyógyulási folyamatok tanulmányozását és potenciális biomarkerek azonosítását, amelyek segítségével

előrejelezhető a trabekulektómia utáni komplikációk megjelenése, valamint olyan szájüregi laphámrák-specifikus potenciális nyálbiomarkerek azonosítását, amelyek a magyarországi populációra jellemzőek. Emellett szándékomban állt a proteomika minél szélesebb körű alkalmazhatóságának igazolása, a CaPpz1 gomba-specifikus foszfatáz pontos szerepének felderítése, valamint komplex, rendszerszintű hálózatelemzési módszerek kidolgozása, és alkalmazása a minőségi és mennyiségi proteomikai adatok együttes elemzése céljából.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vegyszerek

A kísérletek kivitelezése során felhasznált vegyszerek és oldatok nagy tisztaságúak (electrophoresis grade vagy chromatography grade) voltak, és a Merck/Sigma-tól kerültek beszerzésre. A más cégtől származó reagenseket és fogyó eszközöket az első említésükkor zárójelben jelöltem.

Minták

A humán minták gyűjtése az érvényben levő szabályoknak és a Helsinki Egyezményben foglaltaknak megfelelően, a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyásával történt (3385–2011, 2980-2009, 4078-2013, 2885-2008, 4701A-2016). A betegek minden esetben megkapták a megfelelő tájékoztatást, és írásos beleegyező nyilatkozat formájában beleegyezésüket adták a vizsgálatok elvégzéséhez. Minden mintatípus esetében a mintagyűjtés után maximum 2 órán belül munkatársaimmal a mintákat feldolgoztuk, és -70 °C-on lefagyasztottuk. Az analízis során minden mintát csak egyszer olvastottunk fel, a felolvasztott mintát azonnal felhasználtuk. A vizsgálatok előtt a minták fehérje tartalmát Bradford módszerrel határoztuk meg.

A könny-mintavétel standard kapilláris mintavételi technikával, a kötőhártya ingerlése nélkül, üveg-kapillárisal (VWR) történt 2 percen keresztül. Az egyedi mintákat lecentrifugáltuk, majd a felülúszókat 5 µl-es adagokra osztottuk és azonnal -70 °C-on lefagyasztottuk. A mintagyűjtés előtt a donorok szemészeti vizsgálaton estek át, és csak azoktól a donoroktól vettünk könnymintát, akiknek kórelőzményében nem szerepelt autoimmun betegség vagy szisztémás gyulladás, illetve a szemész nem talált a vizsgált betegségen kívül más kóros szemészeti elváltozást.

A csarnokvíz mintákat a Debreceni Egyetem ÁOK Szemészeti Klinikán, trabekulektómia műtét közben gyűjtötték. A mintákat üveg kapilláris segítségével limbális paracentézist alkalmazva a műtétet végző szakorvos gyűjtötte. Gyűjtés után rögtön jégre tették a mintákat, majd jégen a Proteomika Szolgáltató Laboratóriumba szállították. Itt a könnyhöz hasonlóan a mintákat lecentrifugáltuk, szétmértük és azonnal -70 °C-on lefagyasztottuk.

A verejték gyűjtése egészséges önkéntesektől szaunában történt. A szaunázás előtti 24 órában az önkéntesek nem használtak testápolót, tusfürdőt, illetve dezodort. A hő hatására a bőrön képződő verejtékcseppeket üveg kapilláris segítségével a bőr érintése nélkül összegyűjtöttük. A mintákat lecentrifugáltuk, a felülúszót pooloztuk, beszárítottuk, visszaoldottuk ammónium bikarbonát oldatban, majd 100 µl-es adagokra osztottuk és azonnal -70 °C-on lefagyasztottuk.

A nem stimulált nyálmintákat 50 ml-es centrifugacsövekbe gyűjtöttük. Az egyedi mintákat 5 µm-es pórusátmérőjű PVDF membránszűrőn (Millipore) átszűrtük, majd a szűrletet 200 µl-es adagokra osztottuk és azonnal -70 °C-on lefagyasztottuk. A mintavétel a fogszakorvosi rendelőben történt fogász szakorvos által, és a mintavétel után teljes státuszvizsgálat következett. A daganatos betegek esetében a mintavétel után a szájsebészen biopszia vétele is történt, amit a Patológiai Intézetben vizsgáltak meg. Minden tumor esetében a szakorvos meghatározta a tumor lokalizációját, a TNM szerinti besorolását, a tumor stádiumát és differenciáltsági állapotát.

A sejt kultúrák esetében a Rajnavölgyi Éva professzor asszony munkacsoportja (Debreceni Egyetem ÁOK, Immunológiai Intézet) által készített sejt kultúrákról a tápfolyadékot összegyűjtöttük, lecentrifugáltuk, majd a felülúszót azonnal -70 °C-on lefagyasztottuk. A sejteket először mostuk, majd lízis pufferrel lizáltuk. A lizátumokat lecentrifugáltuk, a tiszta felülúszót -70 °C-on lefagyasztottuk.

A cappz1 mutáns és kontroll *Candida albicans* törzseket Dombrádi Viktor professzor úr munkacsoportja (Debreceni Egyetem ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet) azonos körülmények között tenyésztette. A QMY23 kontroll és *cappz1* hiányos törzsek csak a CaPPZ1 gén jelenlétében különböztek egymástól, egyébként genetikailag azonosak voltak. Az egyetlen megfigyelhető különbség a két törzs között az volt, hogy a *cappz1* törzsek lassabban növekedtek. Tekintve, hogy a tenyésztés addig történt, amíg az OD₆₄₀ elérte a 0,8-as értéket, a két törzs tenyésztési ideje kissé eltért egymástól: a kontroll törzset kb. 5,5 óra, míg a *cappz1* törzset 6 óráig tenyésztették. A törzseket begyűjtés után homogenizálták, centrifugálták, és mi a tisztított felülúszót használtuk fel a vizsgálatokhoz.

Az üvegtest minták esetében az egerek kezelését és az üvegtest eltávolítását Dr. Petrovszki Goran (Debreceni Egyetem ÁOK, Szemészeti Klinika) munkacsoportja végezte. Az egerekből eltávolított szemeket azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztották. Az üvegtest izolálásához a szemeket felolvasztották, az üvegtesteket izolálták, amelyeket munkatársaimmal azonnal lízis pufferbe tettünk és feldolgoztunk.

A HIV-1 transzdukált sejt lizátumokat Tőzsér József professzor úr munkacsoportja (Debreceni Egyetem ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) hozta létre. A transzdukcióhoz 5 ng reverz transzkriptáz-ekvivalens HIV-1 pszeudoviriont használtak 4 µg/ml polibren (Sigma-Aldrich) jelenlétében. A kontroll sejtek esetében csak pszeudovirion-mentes tápfolyadékot adtak a sejtekhez. A transzdukció után azonnal (0 óra), 4 óra, illetve 12 óra elteltével a sejteket tripszinizálták 10 percre, majd háromszor

mosták hideg PBS-ben. A mosás után a sejteket 4 ml cOmplete proteáz inhibitor koktéllal (Sigma-Aldrich) kiegészített lízis pufferben szuszpendálták. A tisztított lizátumok kerültek a laboratóriumunkba, ahol acetonos fehérje kicsapást végeztünk. A fehérje csapadékot ammónium bikarbonát oldatban vettük fel, és tripszines oldatban emésztésnek vetettük alá.

MRM/SRM módszertervezés

Ahhoz, hogy megfelelő MRM/SRM-alapú célzott módszereket tudjunk tervezni, szükség van a fehérje aminosav szekvenciájának pontos ismeretére. A célfehérjék aminosav szekvenciáját a UniProt (www.uniprot.org) adatbázisból töltöttük le. Mivel a tömegspektrometriás analízisek során alkalmazott enzimatikus emésztéskor tripszint használunk, a fehérje szekvenciákat *in silico* tripszinnel hasítottuk a UniProt oldalról elérhető PeptidCutter segítségével. Azon peptidek esetében, ahol a tripszin hasítás valószínűsége >95% volt, specificitási analízist végeztünk. BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) program segítségével egyenként megvizsgáltuk a triptikus peptideket, és az MRM/SRM átmenetek tervezéséhez azokat a peptideket használtuk, amelyek csak a vizsgálandó fehérjére jellemzőek. Ez azért volt szükséges, hogy biztosítani tudjuk a módszer megfelelő specificitását, és kizárjuk a lehetséges fals pozitív jelek megjelenését. Az átmenetek tervezéséhez a Skyline (<https://skyline.ms/>) szoftvert használtuk, és a megtervezett MRM/SRM átmeneteket - vagyis az egyes kvadrupólokban beállítandó m/z értékeket - egy tömegspektrometriás módszerfájlba integráltuk. A módszerfájlt megfelelő pozitív és negatív kontrollon alkalmazva tovább optimalizáltuk a beállításokat, megkerestük az optimális ütközési energia értékeket. Akkor minősítettük megfelelőnek az MRM/SRM átmeneteket, amikor nem adtak jelet a negatív kontrollon, és koncentrációfüggő specifikus jelet adtak a pozitív kontrollon. Ezután a megfelelőnek bizonyult peptidek esetében megrendeltük a kiválasztott peptideknek megfelelő stabil izotóppal jelölt (SIL) peptid párokat, majd ezeket ismert mennyiségben a tömegspektrometriás analízisek előtt a mintákhoz kevertük. A SIL peptideket a JPT Germany cégtől vásároltuk; mindegyik peptid stabil izotóppal jelezett C-terminális Lys vagy Arg-t tartalmazott. A terminális Lys vagy Arg esetében a C13 vagy N15 izotópokat oly módon kombinálták, hogy 6 Da, ill. 8 Da tömegkülönbség volt megfigyelhető a szintetikus SIL, és a vizsgálni kívánt peptidek között. Minden fehérje esetében lehetőség szerint két peptidet, peptidenként legalább két MRM/SRM átmenetet vizsgáltunk.

Fehérjék emésztése

Az oldatban emésztés során a fehérjéket először 6 M urea segítségével 30 percig szobahőmérsékleten denaturáltuk, majd redukáltuk. A redukálás minden esetben 37 °C-on, 60 percig 10 mM DTT (Bio-Rad) segítségével történt. A redukált –SH csoportokat 20 mM jódiacetamid (IAA) (Bio-Rad) segítségével 45 percig, szobahőmérsékleten, sötétben alkiláltuk, hogy megakadályozzuk a kénhidak

nem kontrollált újraalakulását, majd a mintát 25 mM-os ammónium bikarbonát oldattal úgy hígítottuk, hogy az urea koncentrációja 1M legyen. A tripszines emésztés 1:25 arányban MS minőségű, stabilizált tripszinnel (Sciex) 37 °C-on egy éjszakán át történt. A fehérje emésztményt beszárítottuk, majd feloldottuk 1% hangyasavat tartalmazó vizes oldatban, és reverz fázisú C18 töltetet tartalmazó ZipTip (Millipore) pipetta hegyek segítségével megtisztítottuk a sóktól és egyéb hidrofil szennyező anyagtól. A C18-as töltetről eluált peptideket ismét beszárítottuk, majd 1% hangyasavban történő feloldás után tömegspektrometriás analízisnek vetettük alá.

A gélcsíkokat vagy foltokat kb. 1 cm³-es darabokra vágtuk, majd 50% acetonitril tartalmú 25 mM-os ammónium bikarbonát oldat segítségével festékmentesítettük. A festékmentesítés után 20 mM DTT tartalmú oldattal, 56 °C-on inkubálva 60 percig elvégeztük a redukálást, majd a DTT tartalmú oldatot kidobva és 55 mM IAA oldatot rárétegezve, szobahőn és sötétben inkubálva 45 percig elvégeztük az előző lépésben redukált tiol csoportok alkilálását. A kétdimenziós gélekből kivágott foltok esetében a redukálás és alkilálás lépéseket kihagytuk, ugyanis ezek már megtörténtek az izoelektromos fókuszáló gélek ekvibrálása során. A géldarabokat vákuumkoncentrátorban kiszárítottuk és a szárított géldarabokra 100 ng stabilizált, MS minőségű tripszint tettünk ammónium bikarbonát oldatban. A tripszines emésztést 37 °C-on végeztük egy éjszakán át, majd másnap reggel a tripszint 1 µl koncentrált hangyasav hozzáadásával előidézett savasodás segítségével állítottuk le. A gélből kidiffundált peptideket összegyűjtöttük egy tiszta, megfelelően feliratozott csőbe, majd a géldarabokat 5% acetonitril, 0,1% hangyasav oldattal 30 percig ráztuk, hogy a maradék peptideket is összegyűjtsük. Az extrahálás ezen lépését kétszer ismételtük meg, és a gélről leszívott, peptideket tartalmazó oldatot vákuumkoncentrátor segítségével beszárítottuk. A megfelelő feliratokkal ellátott csövekben levő beszárított peptideket az analízisig -20 °C-on tároltuk.

Tömegspektrometriás analízis

A tömegspektrometriás analízis nLC II nanoHPLC-vel (Bruker) kapcsolt 4000 QTRAP (AB Sciex) tömegspektrométeren történt. A fehérje azonosításhoz a peptideket 300 nl/perc áramlási sebesség mellett 90 perces víz-acetonitril gradiens segítségével választottuk el Zorbax 300SB-C18 analitikai oszlopon (Agilent), miután Zorbax 300SB-C18 töményítő oszlopon (Agilent) dúsítottuk és a kísérő puffer komponensektől megszabadultunk. A mintát MicroIon forrás segítségével juttattuk be a tömegspektrométerbe. Az MRM/SRM-alapú analízisekhez hasonló paramétereket, de 30 perces gradienst alkalmaztunk.

A fehérjék azonosításához információ-függő adatgyűjtést használtunk, amelynek során először egy felderítő pásztázást (tömegtartomány: 440-1400 amu) végeztünk. Ezt követően a három legintenzívebb csúcs töltöttségi fokának meghatározása, majd a töltöttségi fokok alapján számolt energiával, a csúcsokhoz tartozó peptidek fragmentálása és a fragmensek analízise történt. A fehérjék azonosítását a

tömegspektrométer által rögzített MS/MS adatok alapján a ProteinPilot (Sciex) szoftver segítségével végeztük el. Azokat a fehérjéket fogadtuk el találatként, amelyeket legalább két olyan peptiddel sikerült azonosítani, amelynek a konfidencia értéke minimum 95% volt.

Az MRM/SRM analízishez az MRM/SRM módszer tervezésénél megállapított és optimalizált paramétereket felhasználva módszerfájlokat készítettünk, és ezek segítségével történt az adatgyűjtés pozitív MRM módban. Minden mérést duplikátumban végeztünk, az adatok értékeléséhez a Skyline szoftvert használtuk.

A jelölés nélküli kvantitálási kísérleteket kollaborációs partnereink végezték; a nyál elemzése a Szegedi Biológiai Központ Proteomika Laboratóriumában történt, míg a HIV-1 transzdukció és a verejték vizsgálata során végzett analízisek az Arizonai Egyetem Proteomika Laboratóriumában készültek.

Kétdimenziós elektroforézis

A QMY23 és a *cappz1* deléciós mutáns *Candida albicans* törzseket tartalmazó mintákat proteáz és foszfatáz inhibitorokat tartalmazó sejtlyázatok formájában kaptuk meg kollaborációs partnerünktől (Prof. Dombrádi Viktor, DE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet). A sejtlyázatok fehérje koncentrációját Bradford módszerrel határoztuk meg, majd 450 µg-nyi fehérjét tartalmazó mintát Ready-Prep CleanUp Kit (Bio-Rad) segítségével tisztítottunk a gyártó utasításainak megfelelően, és passzív rehidrációval pH 4-7 izoelektromos fókuszáló gélre (Bio-Rad) vittük fel.

Az egér üvegtesti mintákat a kollaborációs partnerünk (Dr. Petrovski Goran, ÁOK Szemklinika) által történő üvegtest izolálása után azonnal 7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS és 30 mM Tris-HCl tartalmú pufferbe tettük, pipettával szuszpendáltuk, majd jégen szonikáltuk 5 percig. Ez után egy centrifugálás segítségével (500xg, 4 °C, 10 min) megszabadultunk a sejtörmeléktől és a felülúszót Ready-Prep CleanUp Kit (Bio-Rad) segítségével tisztítottuk az előzőekben ismertetett módon, majd passzív rehidrációval pH 3-10 izoelektromos fókuszáló gélre (Bio-Rad) vittük fel.

Az izoelektromos fókuszálást a következő beállításokkal végeztük el: 300 V feszültséggel 3 órán át sómentesítettük a mintát, majd fokozatosan, 5 óra alatt a feszültséget 3500 V-ra emeltük, és 3500 V-on tartottuk 18 órán át. A fókuszálást követően a géleket -70 °C-on tároltuk az ekvilibrálásig. A géleket 15 percig 0,6% DTT, 500 mM Tris-HCl (pH 8,5), 6 M urea, 2% SDS, 20% glicerol és brómfenolkék tartalmú, majd újabb 15 percig 1,2% jódiacetamid, 500 mM Tris-HCl (pH 8,5), 6 M urea, 2% SDS, 20% glicerol és brómfenolkék tartalmú ekvilibráló pufferben ekvilibráltuk. A második dimenziós elválasztás 12%-os SDS-poliakrilamid gélen Protean Plus Dodeca Cell (Bio-Rad) alkalmazásával 100 mA konstans áramerősséggel történt kb. 24 órán át, amíg a brómfenolkék elérte a gélek alját. A gélek festéséhez kétféle fluoreszcens festéket alkalmaztunk. A ProQ Diamond (Thermo Life Technologies) festék csak a foszforilált fehérjékhez kötődik, így csak azok válnak detektálhatóvá, míg a házilag készített RuBPS

festék az összes fehérjét megfesti. A gél dokumentáció Pharos FXPlus Molecular Imager (Bio-Rad) szkennelést történt a következő beállításokkal: excitáció: 532 nm-en, szkennelés 615 nm-en, 100 μ m felbontással. A gélképek analízisét a Delta 2D 4.4 szoftver (Decodon) segítségével végeztük. A szkennelést készített képek TIFF formátumát betöltöttük a Delta 2D szoftverbe, ahol létrehoztuk a kísérleti elrendezésnek megfelelő csoportokat. Az egyes csoportokba tartozó géleken levő foltokat egymásra vetítettük a szoftver által biztosított „exact mode matching protocol” és „group warping strategy” beállítások segítségével. A „union mode” segítségével egy egyesített gélképet hoztunk létre (fused image), amely az összes foltot tartalmazta. A továbbiakban a foltok detektálása ezen az egyesített gélképen történt, majd a szoftver a foltok körberajzolásával nyert folt területeket visszavetítette az egyes gélekre, és ezeket a területeket - pontosabban az ezekhez a területekhez tartozó intenzitás értékeket - használta fel a mennyiségi analízis elvégzéséhez. A kvantitálás úgy történt, hogy a szoftver az összes detektált folt intenzitásának az összegét 100%-nak minősítette, majd az egyes géleken levő foltok intenzitását az összes intenzitás százalékaként tüntette fel és normalizált folt-térfogatnak nevezte el. Az egyes csoportokhoz tartozó géleken mért átlagos normalizált folt-térfogatokat összevetettük, és a szoftver által elvégzett Student t-tesztben szignifikáns változást mutató értékekhez tartozó foltokat kivágtuk. A kivágott foltokban levő fehérjét MS/MS-alapú tömegspektrometriás fehérje azonosítás segítségével azonosítottuk.

SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

20 μ g totál protein tartalmú könnyminták fehérje tartalmát vizsgáltuk. Az elválasztás 10%-os SDS-poliakrilamid gélben történt 100 A konstans áramerősséggel 1 órán át. A gélfestéshez Coomassie PageBlue (Fermentas) oldatot használtunk a gyártó utasításainak megfelelően, és a gélképet Pharos FX Plus lézer szkennelést (Bio-Rad) segítségével rögzítettük. A gélkép analízisét a QuantityOne szoftver (Bio-Rad) segítségével végeztük, így határoztuk meg az egyes sávok intenzitását.

Immunológiai módszerekkel történő vizsgálatok

A multiplex immungyöngy-alapú és ELISA analízisek során a gyártó által javasolt protokollok szerint jártunk el. A nyálmintákban az IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α és VEGF analízisét Custom 6plex Milliplex kit (Merk-Millipore) segítségével végeztük el. A könnyben és csarnokvízben az FGFb, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α és VEGF citokinek mennyiségét Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay (Bio-Rad) segítségével határoztuk meg. A könny esetében 1:25-ös, míg a csarnokvíz esetében 1:2-es hígítást alkalmaztunk. A leolvasás mindegyik multiplex kit esetében BioPlex 2.0 rendszeren (Bio-Rad), az adatok kiértékelése pedig BioPlex Manager 4.0 (Bio-Rad) szoftver segítségével történt.

Az IL-6, tioredoxin, S100A9 és hBD2 mennyiségét kvantitatív ELISA kitek segítségével határoztuk meg (IL-6 – EK0410 Boster Biological Technology, tioredoxin – EK1254 Boster Biological Technology, S100A9 – E-EL-H1290 Elabsience Biotechnology, hBD2 – EK-072-37 Phoenix Pharmaceuticals) a gyártó utasításainak megfelelően.

Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai analízise során először megvizsgáltuk az eloszlást. Normál eloszlás esetén Student féle t-tesztet használtunk, míg nem normál eloszlás esetén nem parametrikus Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk. A trabekulektómia utáni komplikációk vizsgálatánál alkalmazott lineáris modellt és az ANOVA analízist az Olink (Svédország) cég végezte. Az MRM/SRM adatok statisztikai elemzése során a Skyline szoftverbe beépített MsStat programcsomagot használtuk, majd az eredményeket post-hoc teszt segítségével korrigáltuk. A potenciális biomarkerek vizsgálatára ROC (Receiver Operating Characteristic) statisztikát alkalmaztunk. A HIV-1 transzdukció hatásának vizsgálata során figyelembe véve, hogy a technikai replikátumok adatai általában a Poisson eloszlást követik, míg a viszonylag nagy biológiai variancia általában a negatív binomiális eloszlással modellezhető, egy módosított általános lineáris modellt alkalmaztunk, majd az eredményeket post-hoc teszt segítségével korrigáltuk. A statisztikai analízisekhez a Dr. Emri Miklós által fejlesztett R-alapú szoftvert használtuk.

Hálózatok tanulmányozása

A hálózatok megrajzolásához String adatbázist használtuk közepes szigorúságú kapcsolatokat (interakciós érték kb. 0,7) figyelembe véve. A vizsgált hálózatokban az egyes GO (www.geneontology.org/) funkciók feldúsulását a String-be beépített elemzés segítségével vizsgáltuk. A csomópontok (fehérjék) funkció szerinti színezéséhez is a String által biztosított lehetőséget használtuk. A String a rendelkezésre álló interakciós adatok alapján színezi a fehérjék közötti kapcsolatokat. A cián és magenta szín az ismert interakciókat jelöli (cián az adatbázisokban levő adatra, míg a magenta a kísérletes adatra utal), a zöld, piros és kék színek a prediktált interakciókra vonatkoznak, a sárga szín az adatbányászattal, fekete a koexpresszióval, ill. a világoskék a fehérje homológia alapján meghatározott interakciókat jelöli. A jelölések színén nem változtattunk, de az elemzések során nem vettük figyelembe az egyes színek által jelölt különbségeket.

A HIV-1 transzdukció során generált bináris hálózatok esetében is a hálózat készítésekor a String adatbázist használtuk (String-R programcsomag), de itt a $>0,95$ interakciós értéket állítottuk be, így csak az igen nagy valószínűségű (biztos) fehérje-fehérje interakciókat vettük figyelembe. A hálózatokat úgy alkottuk meg, hogy az NW hálózat a HIV-1 kezel és kontroll 0 órás mintáiból azonosított fehérjéket tartalmazta, a C04 és C12 hálózatok a 4, ill. 12 órás időpontban begyűjtött kontroll minták fehérjéit, míg a

H04 és H12 hálózatok a HIV-1 kezelt sejtekből 4, ill. 12 óra után begyűjtött minták fehérjéit tartalmazták. Az így generált bináris hálózatokban a csomópontok a fehérjék, míg az élek a fehérje-fehérje interakciók lehetőségét jelentik, ugyanis az adatbázisban tárolt adatok alapján lehetséges fehérje-fehérje interakció tényleges jelenlétéről a mintáinkban azonosított fehérjék között nincs információnk.

Súlyozott hálózatok létrehozása és tanulmányozása

Ahhoz, hogy a valós interakciókról több információt kaphassunk, a String által generált bináris hálózatokat tovább módosítottuk. A tömegspektrometriás analízis során kapott mennyiségi információkat használtuk fel arra, hogy az éleknek súlyt adjunk. Az így kapott súlyozott hálózatokban az élek az interakció valószínűségéről és erősségéről adnak információt. A tömegspektrometriás analízisből kapott mennyiségi adatok felhasználása lehetővé tette, hogy a bináris hálózat biztosította elméleti fehérje-fehérje interakciós lehetőségeket valós, mintaközpontú interakciós hálózatokká alakítsuk, ahol az élek súlya egyenes arányban áll a fehérjék mennyiségével, és fordítottan arányos az összes interakció lehetőségével az adott hálózatban/mintában. Tekintve, hogy a String alkalmas a GO funkciók feltüntetésére és a fehérjék rendezésére a GO funkciók alapján, minden súlyozott Wt,s hálózatban a fehérjéket egy (f) funkció címkével láttuk el, amely mutatta, hogy az adott funkcióhoz tartozik-e a fehérje vagy sem. A funkció szerinti besorolást a String segítségével végeztük, és azokat a String által felsorolt feldúsult GO funkciókat választottuk ki a további analízisekhez, ahol hálózatonként legalább 10 fehérje tartozott az adott funkcióhoz. Ily módon minden kiválasztott GO funkcióhoz egy funkcionális alhálózatot tudtunk definiálni. A funkcionális alhálózat mellett az adott GO funkcióval nem rendelkező fehérjéket, amelyek ily módon nem a funkcionális hálózathoz tartoznak, a „nem funkcionális” alhálózatba soroltuk. A fehérjék közötti interakciók esetében is ugyanezt a felosztást alkalmaztuk: a funkcionális hálózat elemei közötti kapcsolatokat funkcionális kapcsolatoknak, a nem funkcionális hálózat elemei közötti kapcsolatokat nem funkcionális kapcsolatoknak neveztük el. Előfordult olyan eset is, amikor a funkcionális alhálózatba tartozó fehérje a nem funkcionális alhálózat egyik elemével létesített kapcsolatot, ezeket a kapcsolatokat kereszt kapcsolatoknak neveztük el (c), és az ilyen kapcsolatokat tartalmazó hálózatot kereszt hálózatként definiáltuk. Az általunk definiált súlyozott fehérje-fehérje interakciós hálózatok csomópontokat (N) és éleket (E) tartalmaznak. A csomópontok minden hálózat esetében a fehérjék, míg az élek a fehérjék közötti interakciók. A vizsgálatok során az alábbi hálózati paramétereket számoltuk ki: csomópontok (N) és élek (E) száma, hálózati erősség (S), élsűrűség (D), él arány (R). Az N, Nf és Nn a teljes hálózatban, valamint a funkcionális, ill. nem funkcionális alhálózatban levő csomópontok (fehérjék) számát mutatja. E az élek (interakciók) számára vonatkozik a teljes hálózatban, az Ef és En az élek számát mutatja a funkcionális, ill. nem funkcionális alhálózatban, míg az Ec a funkcionális - nem funkcionális alhálózatba tartozó fehérjék közötti interakciókat mutatja. A hálózati erősséget (S) a súlyozott élek összegeként

definiáltuk, kiszámítottuk a funkcionális (Sf) és nem funkcionális (Sn) alhálózatokra jellemző értékeket, valamint a funkcionális - nem funkcionális keresztkötésekre jellemző (Sc) értékeket. Az élsűrűség (D) azt mutatja meg, hogy a súlyozott hálózati erősség (S) hogyan aránylik a maximálisan telített hálózathoz. Az élsűrűséget meghatároztuk a teljes hálózatra (D), a funkcionális (Df), nem funkcionális (Dn), valamint a kereszt (Dc) alhálózatokra. A hálózati erősséget figyelembe véve kiszámoltuk az él arányt (R) az alhálózatokra vonatkozóan. Mivel az hálózati paraméterek eloszlása nem a Gauss-i vagy a negatív binomiális eloszlást követte, ezért Wilcoxon tesztet alkalmaztunk, hogy karakterizálhassuk a csoportspecifikus változásokat a 4 és 12 órás időpontokban. A p értékeket többszörös összehasonlításra korrigáltuk és FDR korrekciót alkalmaztunk.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

A *Candida albicans* PPZ1 szerepének vizsgálata kétdimenziós elektroforézis segítségével

Annak érdekében, hogy több információt nyerjünk arról, hogy a *cappz1* gén terméke hogyan fejti ki biológiai hatását, kétdimeziós elektroforézis segítségével megvizsgáltuk a *C. albicans* proteómját, valamint foszfoproteómját kontroll (QMY23) és *cappz1* hiányos (*cappz1*) törzsekben. Arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen változások tapasztalhatók a *C. albicans* proteómjában a CaPpz1 protein hiányában. Először összehasonlítottuk a ProQ Diamonddal festett, csak a foszforilált fehérjéket megjelenítő foltokat a kontroll és a mutáns törzsek esetében, majd ez után a ProQ Diamonddal festett géleket RuBPS-el újra festettük. A RuBPS az összes fehérjét megfesti, így a foszforilált fehérjék esetében végzett összehasonlítást elvégeztük a RuBPS-el festett géleken is, majd a különbséget mutató foltokat kivágtuk további elemzés céljából. Összesen 25 olyan fehérjét sikerült azonosítani, amely mennyisége vagy foszforilációja (vagy mindkettő) statisztikailag szignifikáns változást mutatott a CaPpz1 hiányában. A foszfoproteineket megfestő festék segítségével megjelenített foszforilációban megfigyelt változásokat több okra vezethetjük vissza: 1) a foszforilációban nem történik változás, de a fehérje mennyiségében igen, 2) a fehérje mennyiségében nem történik változás, és a megfigyelt változás a foszforiláció megváltozott mértékének tudható be, vagy 3) változás történik mind a fehérje mennyiségében, mind a foszforilációjában. A 2) csoportba sorolt azon fehérjék, ahol a foszforiláció mértéke növekedést mutatott a delécio hatására, potenciális szubsztátjai lehetnek a CaPpz1-nek. Eredményeink alapján az Eft2, a még nem karakterizált Rad32, a 60S riboszómális fehérje Rpp0, a Tif1 és az Uba1 egyik proteoformája direkt szubsztátjai lehetnek a CaPpz1-nek. A 25 fehérje funkcionális analízise azt mutatta, hogy a fehérjék majdnem fele (12 fehérje) a fehérje szintézisben, kettő pedig a fehérjék proteoszómában történő degradációjában játszik szerepet. A fehérje szintézisben szereppel bíró fehérjék mennyisége csökkent, míg az ubikvitin aktiváló enzim 1 (Uba1) mennyisége nőtt a deléciós mutáns *C. albicans* mintákban.

Eredményeink arra utalnak, hogy a CaPpz1 deléciónak gátló hatása van a fehérje szintézisre. Ehhez hasonló eredményeket kaptak *S. cerevisiae* vizsgálatával más kutatócsoportok, akik kimutatták, hogy a PPZ1-nek szerepe van a transláció szabályozásában és az EF1Ba/Efb1 translációs elongációs faktor a PPZ1 szubsztrátja. Eredményeink alapján a CaPpz1 foszfatáz a *C. albicans*-ban módosítja a fehérje szintézist. Mivel mindkét feltételezett szubsztrát, az Eft2 translációs faktor és az Rpp0 riboszómális fehérje a translációban játszik szerepet, elképzelhető, hogy a foszfatáz ezek révén fejt ki hatását a fehérje szintézisre. Ugyanakkor az is megfigyelhető volt, hogy a 25 fehérjéből 17 szerepet játszik a biofilm képződésében. Ez alapján, a kollaborációs partnerünk megvizsgálta a vad és mutáns *C. albicans* törzsek biofilm képző képességét. Eredményei szerint a szelektív Spider médiumban a CaPpz1 hiányos törzsek jobb biofilm képző tulajdonságokkal rendelkeztek, mint a kontroll, vad törzsek, ami arra utal, hogy a laboratóriumi kísérleti körülmények között a CaPpz1-nek valóban szerepe van a biofilm képződésében. A biofilm képződésében szerepet játszó fehérjék nagy része a hálózatelemzésünk szerint direkt kapcsolatban áll az Eft1 és/vagy a Rpp0 Ppz1 szubsztrátokkal, így magyarázható, hogy a CaPpz1 hiánya hogyan kapcsolódik a fehérje szintézishez és a biofilm képződéséhez. Ezen kívül egyes metabolikus enzimek, akár különállók, akár a hálózathoz kapcsolódnak, részt vehetnek a biofilm képzésében metabolikus vagy más funkcióik révén. Mivel a teljes hálózatelemzés a *S. cerevisiae* ortológokkal történt, további vizsgálatok szükségesek a fenti hipotézis megerősítésére. Ugyanakkor fontos azt is szem előtt tartani, hogy a Spider táptalajon megfigyelt változások nem biztos, hogy fiziológiásan is jelentősek, ami tovább növeli a megerősítő vizsgálatok szükségességét. Mindenesetre eredményeink azt mutatják, hogy a kétdimenziós elektroforézissel nyert proteomikai és foszoproteomikai adatok segíthetnek új lehetséges foszfatáz szubsztrátok, és biológiai funkciók (biofilm képzés) azonosításában.

Proliferatív vitreoretinopátia tanulmányozása kétdimenziós elektroforézis segítségével

A PVR patogenezisének tanulmányozására alkalmazott egér modellben intravitrealis diszpáz befecskendezéssel a PVR-hez morfológiailag hasonló állapotot idézett elő kollaborációs partnerünk. A PVR-szerű állapot megjelenését OCT (Optical Coherence Tomography) vizsgálattal bizonyították, majd a diszpáz kezelést követő 14. napon, amikor igazoltan megjelentek a PVR-re jellemző elváltozások az egerek szemét eltávolították és az üvegtestet izolálták. Az izolált üvegtest fehérje profilját kutatócsoportunk kétdimenziós elektroforézis segítségével vizsgálta és összehasonlította a kontrollként szolgáló, fiziológiás sóoldattal kezelt egerek üvegtesti mintáiban tapasztalt fehérje profillal. Mindkét csoport esetében három biológiai párhuzamossal dolgoztunk, és a három gél átlag értékeit vettük figyelembe a kvalitatív és kvantitatív változások elemzésekor. A legnagyobb változást a krisztallinok esetében tapasztaltuk, ugyanis 19 folt tartalmazott valamilyen krisztallin variánst. Nyolc foltban találtunk alfa A krisztallint és megállapítottuk, hogy a mennyiségük csökkent a diszpáz kezelés hatására. Ez alól

kivételt az alfa B krisztallin jelentett, amelynek a mennyisége emelkedett a kezelés eredményeként. Az általunk tanulmányozott modellben feltehetően a PVR-t megelőző retina leválás okozta stressz hatására fellépő apoptózis, illetve a PVR-re jellemző proliferatív állapotok markere lehet az emelkedett alfa B krisztallin. Az nem ismert, hogy mennyiségének növekedése okozza-e a retina pigment epitél (RPE) sejtek apoptózisának gátlását kaspáz 3 vagy 6 gátlásával, így elbillentve az egyensúlyt az RPE sejtek proliferációja irányába, vagy a proliferáló RPE sejtek termelnek több krisztallint, ami stimulálja és fenntartja az RPE sejtek proliferációját. Tulajdonképpen mindkét lehetőségnek ugyanaz a következménye: megnő az RPE sejtek proliferációja. Ahhoz, hogy jobban megértsük a PVR hatásmechanizmusát és kihasználjuk az egérmódel adta lehetőségeket, egy olyan knock-out egeret (KO) alkalmaztak kollaborációs partnereink, amely nem tartalmazta a transzglutamináz 2 (TG2) enzimét. Az előzőekben ismertetett diszpáz kezelést elvégezték TG2 hiányos egereken is, így egy olyan vizsgálati rendszert kaphattunk, amely kiváló lehetőséget biztosít többféle hatás együttes tanulmányozására. A normál egerek üvegtestének vizsgálatával egyidejűleg elvégeztük a TG2 KO egerek üvegtesti mintáinak kétdimenziós elektroforézisét is. A diszpáz kezelés hatására az alfa-2 makroglobulin, béta aktin-szerű fehérje, G fehérje, gliceraldehid-3 foszfát dehidrogenáz, heterogén nukleáris ribonukleoprotein, laktát dehidrogenáz, peroxiredoxin, rekoverin, szerotranszferrin és tubulin mennyisége csökkent, míg a béta krisztallin A1, griffin, ferritin L és H lánc mennyisége emelkedett. Az alfa krisztallin A lánc esetében egyes foltokban növekedést, míg másokban csökkenést tapasztaltunk a diszpáz kezelés hatására. A TG2 KO egerekben a vad típusú egerekhez hasonlóan a diszpáz kezelés eredményeként egy jelentős, krisztallinokat érintő poszt-transzlációs módosítás történt, viszont itt a mértéke nagyobb volt, mint a vad típusú egerekben tapasztalt változás. A módosítások pontos hátterét nem ismerjük, de tekintve, hogy a diszpáz egy proteáz, a TG2 pedig keresztkötő enzim, míg a krisztallin TG2 szubsztrát, előfordulhat, hogy a TG2 által létrehozott keresztkötések egyfajta védelmet biztosítanak a diszpáz általi hasítással szemben. Természetesen, ezek csak feltételezések, mert kísérleti rendszerünk által biztosított adatok nem nyújtanak elegendő információt a kérdés megválaszolásához.

Munkánk további eredményeket szolgáltatott a diszpáz hatására módosuló fehérje profilokra vonatkozóan, és kimutattuk a krisztallinokat érintő nagymértékű változásokat. Ugyanakkor a TG2 hiányában a diszpáz hatására jellemző információt is gyűjtöttünk, amely bizonyítja a TG2 aktív szerepét a PVR patomechanizmusában. A PVR tanulmányozására alkalmazott egér módel lehetőséget biztosít a dinamikus gyógyszerfejlesztési és tesztelési lépések kivitelezésére, reményeink szerint elősegítve a hatékony terápiás eljárások kifejlesztését.

A könnyben, nyálban, verejtékben levő kémiai barrier vizsgálata és potenciális biomarkerek azonosítása

A különböző testfolyadékok, úgymint a verejték, nyál, könny stb. a testünket védő kémia barrier részét képezik és jelentős mennyiségű AMP fehérjét tartalmaznak. Az egyes testfolyadékokban biomarkerként azonosított fehérjék kb. 30%-a az AMP csoportba tartozik. Az a tény, hogy eddig kevesebb, mint 200 fehérjéről mutatták ki az antimikrobiális és immunmodulátor tulajdonságokat, és hogy az eddig azonosított számos biomarker majdnem 1/3-a AMP, egy figyelemreméltó tulajdonságokkal rendelkező csoportra utal. Természetesen ennek egyik oka lehet az is, hogy bizonyos testfolyadékok esetében csak az abundáns, főként AMP tulajdonsággal bíró fehérjéket tudtuk tanulmányozni, és a kisebb mennyiségben jelen lévő fehérjékről nem volt alkalmunk kellő mennyiségű és minőségű információt gyűjteni.

Munkám során az egyik fő célom a kémiai barrier tanulmányozása volt. Kutatócsoportommal olyan kvantitatív proteomikai technikákat fejlesztettünk és optimalizáltunk, amelyek alkalmazhatók a kémiai barrier komponenseinek vizsgálatára. Módszerfejlesztésünket először a nagyobb mennyiségben hozzáférhető és a komplex biológiai rendszerekhez képest kevésbé heterogén sejtkultúra felülúszón kezdtük el, majd az *in vitro* rendszeren megszerzett tudást használtuk a kisebb mennyiségben gyűjthető, betegektől származó testfolyadékokban levő kémiai barrier komponenseinek vizsgálatára.

Humán béta defenzinek vizsgálatára alkalmas MRM/SRM-alapú célzott tömegspektrometriás módszer kifejlesztése

Sikerült kifejleszteni egy szemikvantitatív célzott proteomikai módszert, amelynek segítségével lehetővé válik a humán béta defenzin (hBD) 1, 2, 3 és 4 mennyiségének egyidejű analízise. Az MRM/SRM alapú tömegspektrometriás analízis során az IQGTCYT hBD1 peptidet, a GIGDPVTCLK hBD2 peptidet, a GIINTLQK hBD3 peptidet és az ICGYGTAR hBD4 peptidet vizsgáltuk. Az optimalizált módszer a klasszikus antitest alapú vizsgálatok egy reális alternatívájaként szolgálhat, elsősorban olyan esetekben, amikor a mintamennyiség nem teszi lehetővé az egymást követő ELISA analízisek elvégzését. A kifejlesztett tömegspektrometriás módszert RT-qPCR és ELISA analízisekkel ellenőrizve nagyságrendileg hasonló értékeket kaptunk, valamint az ELISA és a kifejlesztett tömegspektrometriás módszerrel mért hBD2 szintek jó egyezést mutattak ($R=0,9636$, $p<0,0001$). A vizsgálatokat mind sejtkultúra felülúszóban, mind sejtlizátumban elvégeztük SW-1116, HT-29 és Caco2 humán epitél sejteken. A szakirodalomban fellelhető adatoknak megfelelően, sikerült igazolni a hBD2 és hBD3 indukálható jellegét, ugyanis a vizsgált kísérleti rendszerekben IL-1 β gyulladásoos citokin hatására megnőtt mind a szekretált, mind a sejten belüli mennyiségük. A kifejlesztett MRM/SRM alapú kvantitálási módszer segítségével a humán béta defenzin 1, 2, 3 és 4 mennyiségét egészséges felnőttektől származó

könnymintákban megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az Alzheimer kóros betegektől származó könnymintákban nem sikerült a humán béta defenzint kimutatni. Ezzel szemben az egészséges felnőttektől származó könnymintákban mind a négy vizsgált defenzint ki tudtuk mutatni, igazolva a módszerünk használhatóságát humán könnyminták vizsgálatára. A hBD2 mennyisége volt a legalacsonyabb, a hBD3 mennyisége a legmagasabb, míg a hBD1, ill. a hBD4 mennyisége a hBD2 és a hBD3 mennyisége között helyezkedett el, és közel azonos volt.

Eredményeink alapján a kifejlesztett tömegspektrometriás módszer megfelelően működött, és használhatónak bizonyult hBD1, hBD2, hBD3 és hBD4 egyidejű mennyiségi analizisére biológiai mintákban.

Alzheimer kórra jellemző potenciális könny biomarkerek azonosítása

Tekintve, hogy az Alzheimer kórban szenvedő betegek retinájában azonosíthatók az amiloid depozitumok, valamint megváltozik a retina szerkezete, és romlik a betegek látása, azt feltételeztük, hogy ezek a változások érinthetik a könny fehérje profiljának a változását is.

Először gélelektroforézis és tömegspektrometriás analízis segítségével azonosítottuk azokat a fehérjéket, amelyek a beteg és kontroll minták között szignifikánsan eltérő intenzitású sávokban találhatók. Ezen fehérjék mindegyike a védekezésben játszott szerepet, és feltehetően a kémiai barrier részeként részt vett a könny, mint első védelmi vonal kialakításában. Eredményeink és korábbi munkáink alapján olyan MRM/SRM-alapú tömegspektrometriás módszert fejlesztettünk ki, amely alkalmazásával egy időben kaphatunk információt 10 kémia barrier komponens fehérje (lipokalin 1, laktotranszferrin, lizozim C, lakritin, Ig lambda lánc, Zn-alfa 2 glikoprotein, prolaktin indukált fehérje, lipofilin A, galektin 3 kötő fehérje, dermcidin) mennyiségéről. Az optimalizált célzott tömegspektrometriás módszert alkalmazva 14 Alzheimer kórban szenvedő betegtől és 9 korban illesztett kontrolltól származó, összesen 37 egyedi könnymintában megvizsgáltuk ezen fehérjék mennyiségét. Szignifikáns különbséget tapasztaltunk a lipokalin 1, laktotranszferrin, lakritin, lizozim C és prolaktin indukált fehérje szintjében; mennyiségük lecsökkent a betegektől származó mintákban. Ezen könnymirigy által termelt fehérjék mennyiségével ellentétesen változott az epitel sejtek által termelt dermcidin mennyisége: szignifikáns növekedést tapasztaltunk a betegek mintáiban a kontrollok könnymintáihoz viszonyítva. A szignifikáns változásokat mutató fehérjék vagy azok kombinációinak prediktív értékét megvizsgálva ROC analízis segítségével azt találtuk, hogy a legkiegyensúlyozottabb értékeket mutató (specifitás 77%, szenzitivitás 81%) kombináció a lipokalin 1, dermcidin, lizozim C és lakritin kombinációja, amely adataink alapján, potenciális biomarkerként szolgálhat Alzheimer kórban.

Eredményeinkkel igazolni tudtuk, hogy a könnyben található kémiai barrier összetétele megváltozik patológias körülmények között. A szignifikáns különbséget mutató fehérjék, megfelelő validálás után, potenciális biomarkerként használhatók a betegség diagnosztizálása során.

A szemben zajló sebgyógyulási folyamatok tanulmányozása, és olyan potenciális biomarkerek azonosítása, amelyek előrejelezhetik a trabekulektómia utáni komplikációk kialakulását

A zöldhályogra jellemző fehérjék tanulmányozására legáltalánosabban használt biológiai minta a csarnokvíz, melynek fokozott termelése vagy akadályozott elvezetése, illetve a fentiek egyensúlyának megbomlása okozza a megnövekedett szemnyomást. A csarnokvíz vizsgálatával számos zöldhályogra jellemző fehérjét azonosítottak, azonban a csarnokvíz csak műtét során hozzáférhető, ezért szűrésre, műtét utáni követésre nem alkalmazható. Ebben a kontextusban első lépéséként meg kívántam vizsgálni, hogy a könny, mint állandóan termelődő és nem invazív módon gyűjthető biológiai minta fehérje összetétele milyen mértékben tér el a műtét során gyűjtött csarnokvíz fehérje összetételéhez képest. A kérdés megválaszolására 20 trabekulektómiára előjegyzett páciens mintáját vizsgáltuk meg munkatársaimmal. Minden donortól a műtét előtt könnymintát vettünk és a műtét során csarnokvíz mintát gyűjtöttünk. Egy kereskedelmi forgalomban levő multiplex citokin kit (Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay) segítségével 27 citokin koncentrációját vizsgáltuk meg a könnyben és a műtét során gyűjtött csarnokvízben. A citokin szinteket, valamint a betegekről rendelkezésre álló egyéb adatokat felhasználva statisztikai elemzést végeztünk. Megnéztük, hogy a zöldhályog típusa, a nem, a háromnál több vagy kevesebb hatóanyagot tartalmazó szemcseppek alkalmazása, a könnytermelés sebessége, a begyűjtött könny fehérje mennyisége, valamint a késői komplikációk megjelenése alapján képzett csoportok között van-e szignifikáns eltérés a citokinek koncentrációjában. Azt találtuk, hogy három citokin esetben statisztikailag szignifikáns, alacsonyabb értékeket tudtunk kimutatni a komplikációt mutató csoportban. Eredményeink alapján az IFN- γ , az IL-5 és GM-CSF szintje a műtét után egy évvel komplikációt mutató páciensek műtét előtt vett könnyében alacsonyabb értéket mutatott, mint a komplikáció mentes betegek esetében. Eredményeink szerint a három citokin szintjének vizsgálata segíthet a komplikációk megjelenése szempontjából nagyobb kockázatú csoportba történő besorolásnál. Összehasonlítva a könnyben és csarnokvízben mért citokin szinteket, az IL-2 kivételével minden citokin esetben statisztikailag szignifikáns növekedést tapasztaltunk a könnyben a csarnokvízben mért értékekhez képest. Eredményeink alapján a könny és a csarnokvíz nem egyenértékű minták, és a könny vizsgálata feltehetően nem helyettesítheti a csarnokvíz vizsgálatát. Viszont olyan esetekben, amikor ugyanazon beteg több időpontban vett mintáját hasonlítjuk össze (pl. trabekulektómia utáni követéses vizsgálatok), a könny megfelelően használható potenciális biomarker forrás lehet.

A műtét utáni első néhány órában elkezdődik a hosszan tartó sebgyógyulás pontosan szabályozott folyamata. Az egyes fázisok közötti határok nem élesek és nagyban átfednek egymással. Feltételezésünk szerint, a korai időpontokban bekövetkező változások hatással lehetnek a későbbi, fél vagy egy év múlva megjelenő késői komplikációk kialakulására. Azért, hogy több információt nyerhessünk a szemben végbemenő sebgyógyulás komplex folyamatáról, a citokineken kívül más anyagok mennyiségét is meg kívántuk vizsgálni. Ehhez legmegfelelőbb módszernek az ún. Proximity Extension Assay (PEA) módszert tartottuk, amelynek használhatóságát a könnyminták vizsgálatára elsőként igazoltuk. Annak érdekében, hogy több információt nyerhessünk a sebgyógyulás során bekövetkező változásokról és a trabekulektómia után megjelenő komplikációkról, megvizsgáltuk 184 fehérje mennyiségét PEA módszerrel. A pácienseket két csoportba soroltuk: „komplikációt mutató” és „komplikáció mentes” csoportokba. A minőségi és mennyiségi változásokat megvizsgálva azt találtuk, hogy az immunválaszt elősegítő, proliferációt, illetve sebgyógyulást serkentő és extracelluláris mátrix átrendeződést előidéző molekulák előfordulási gyakorisága és/vagy mennyisége megemelkedett a komplikációt mutató csoportban. Ezzel egy időben azon molekulák mennyisége is emelkedett, amelyek alacsony szintje vagy hiánya a sebgyógyulás elhúzódását eredményezi (pl. SOD2, GLO1). Ugyanakkor a sebgyógyulás szabályozásában szerepet játszó fehérjék kevésbé jelentek meg a komplikációt mutató csoportban, akárcsak a szénsav anhidráz, amely alacsony szintje a keloidos sebgyógyulásra jellemző. Ezen információk arra engedtek következtetni, hogy a sebgyógyulás egyensúlya a komplikációt mutató csoportban elbillen a kifejezettebb sebgyógyulás irányába, hozzájárulva ezzel a késői műtéti komplikációk megjelenéséhez.

Könnyfehérje vizsgálatainkkal adatokat gyűjtöttünk a sclera sebgyógyulási folyamataira vonatkozóan, és sikerült olyan könny biomarkereket azonosítani, amelyek előrejelezhetik a trabekulektómia után bekövetkező, lebennyel kapcsolatos problémákhoz köthető késői komplikációkat.

A nyál kémiai barrierjének vizsgálata és szájüregi laphámrák-specifikus potenciális biomarkerek azonosítása

A nyál fehérje összetételének változásait megvizsgáltuk szájüregi laphámrákban (OSCC) szenvedő betegek és egészséges, korban illesztett kontrollok esetében. Jelölés nélküli kvantitálás során több mint 500 nyálfehérjét azonosítottunk a mintákban, ezek közül 68 esetében figyeltünk meg legalább kétszeres különbséget a mennyiségükben az OSCC és a kontroll csoportok között. A citokróm c és a mucin 7 csak a kontroll mintákban volt megtalálható, míg a komplement faktor H, komplement C5, kortikoszteroid kötő fehérje, heparin kofaktor 3, apolipoprotein E és a szérum paraoxonáz/aril-észteráz csak az OSCC mintákra volt jellemző. A különbséget mutató fehérjék funkcionális és hálózat analízise az immunfolyamatok és a proteolízis megnövekedett aktivitására utalt.

A jelölés nélküli kvantitálás mellett multiplex immungyöngy-alapú és célzott tömegspektrometriás módszereket is alkalmaztunk a nyálfehérjék vizsgálatára. A korábban irodalomban potenciális biomarkerként publikált fehérjék mennyiségét vizsgáltuk meg OSCC-ben szenvedő betegektől, korban illesztett és fiatal kontrolloktól származó nyálmintákban. Az IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α és VEGF szinteket Luminex alapú multiplex módszerrel vizsgáltuk. A kataláz, profilin 1, S100A9 fehérje, CD59, CD44, galektin 3 kötő fehérje, keratin-19 és tioredoxin fehérjék vizsgálatára MRM/SRM-alapú célzott tömegspektrometriás módszert fejlesztettünk ki, és azt optimalizáltuk. Vizsgálataink alapján az IL-6, TNF- α , tioredoxin és S100A9 fehérjék szintje mutatott szignifikáns különbséget a csoportok között. Az adatok statisztikai elemzése során a ROC analízis szerint az IL-6 és a TNF- α kombinációja nem erősítette egymást, az IL-6 önmagában is 82%-os szenzitivitással és 100 %-os specificitással rendelkezett. Az S100A9 és a tioredoxin erősítette egymást, együttes alkalmazásuk 86% szenzitivitással és 67% specificitással tudta jelezni az OSCC-t. Tekintve, hogy adataink alapján a TNF- α vizsgálata nem biztosított plusz előnyt a diagnózis során, a továbbiakban csak az IL-6, S100A9 és tioredoxin mennyiségét vizsgáltuk 26 OSCC-ben szenvedő beteg, 13 korban illesztett kontroll és 7 fiatal kontroll nyálmintájában. Az ellenőrzés során az S100A9 és az IL-6 esetében sikerült szignifikáns különbségeket kimutatni az OSCC és a kontrollok között. A tioredoxin nem bizonyult kellően jó prediktornak, ugyanis csak az OSCC és a fiatal kontroll csoport közötti különbség volt szignifikáns.

Eredményeink alapján sikerült két olyan OSCC-specifikus nyál fehérje biomarkert azonosítani, amely használhatónak bizonyult a magyar lakosság körében. Ugyanakkor vizsgálataink rávilágítottak arra, hogy a különböző populációkban biomarkerként azonosított fehérjék nem általános érvényűek, előtérbe hozva a regionális biomarker kutatások jelentőségét.

A normál verejték tömegspektrometriás analízise, és a nagy mennyiségben jelen levő verejtékfehérjék azonosítása

Egészséges felnőttektől származó verejték jelölés nélküli kvantitálása során 95 verejtékben előforduló fehérjét sikerült azonosítani, amelyek közül 20-at addig még nem írtak le a verejtékben. A szekretált fehérjék közül legnagyobb mennyiségben a dermcidin jelent meg a szekretált fehérjék 46%-át képezve, míg a kluszerin 17%-ot, az apolipoprotein D 15%-ot, a prolaktin indukált fehérje (PIP) 8%-ot, a szérum albumin pedig 6%-ot tett ki. Ezek a fehérjék együttesen képezték a szekretált verejték fehérjék 91%-át. MRM/SRM-alapú célzott proteomikai módszert tervezve a dermcidinre és a PIP-re, sikerült alátámasztani a dermcidin más fehérjéhez viszonyított sokkal nagyobb mennyiségét. A verejték ún. abundáns fehérjeinek azonosítását követően megvizsgáltuk a fehérjék funkcióját, és úgy találtuk, hogy fő szerepük a védekezésben, a kémiai barrier felépítésében van. A dermcidin és PIP feltehetően az antibakteriális védekezésben játszanak szerepet, a kluszerin chaperonként és mátrix metalloproteináz

gátlóként működik. Az apolipoprotein D vélhetően gátolja a lipid peroxidációt, míg az albumin, kötő képessége révén szkevenger funkciót láthat el, megkötve a verejtékben levő molekulákat, illetve DAHK N-terminális tetrapeptidje révén antioxidáns tulajdonságokkal rendelkezhet.

Eredményeink kiindulási alapot biztosíthatnak a további biomarker kutatásokhoz, információt szolgáltatva az egészséges önkéntesektől származó minták fehérje összetételéről.

Komplex, rendszerszintű hálózatelemzési módszerek kidolgozása és alkalmazása a minőségi és mennyiségi proteomikai adatok együttes elemzésére

A modern proteomikai technikák alkalmazásával világszerte a proteomikai laboratóriumok naponta több GB-nyi adatot generálnak. Ezek igen jelentős része nem csak kvalitatív, hanem kvantitatív információkat is tartalmaz. Sok csoport dolgozik azon, hogy olyan szoftveres háttérrel teremtsenek meg, amely segítségével az adatok értelmezhetők, és az adatokban levő biológiai információk kinyerhetők. Egyik ilyen megközelítési lehetőség a minél teljesebb adatelemzéshez, az adatok hálózatban történő megjelenítése és elemzése. Különböző adatbázisokban tárolt információk alapján felrajzolható a mintában azonosított fehérjék fehérje-fehérje interakciós hálózata. Azonban ezek a hálózatok az esetek nagy részében csak bináris hálózatok, azaz a kapcsolat meglétét, vagy hiányát tudjuk vizsgálni, mivel a kvantitatív adatokat kevésbé veszik figyelembe. Munkánk elkezdésekor voltak próbálkozások a kvantitatív adatok beépítésére a hálózatok rajzolásakor, de ezek elég bonyolult matematikai módszereket alkalmaztak, és nem voltak könnyen kivitelezhetők. Munkánk során a cél az volt, hogy az adattudományban gyakran használt súlyozott hálózatot alkalmazzuk a proteomikai adatok elemzésére, és egy egyszerűbb matematikai megközelítés segítségével a hálózatokba építsük be a kvantitatív adatokat is. Ily módon lehetőségünk nyílna árnyalni az interakciók által felrajzolt képet, és pontosabb, vagy akár korábban rejtve maradó következtetéseket levonni. Vizsgálatainkhoz, Tózsér professzor úr (Debreceni Egyetem ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) laboratóriumával együttműködve, a HIV-1 által megváltoztatott gazdasejt proteómot vizsgáltuk és a HIV-1 transzdukció hatására bekövetkező proteomikai változásokat próbáltuk nyomon követni a hálózatokban bekövetkező módosulások tanulmányozásával. A HIV-1 hatására a gazdasejtben egy jelentős átprogramozódás kezdődik; leáll a fehérjék szintézise, kivéve a vírus számára szükséges fehérjéké, illetve a sejtek elkezdik termelni a vírusokat. A folyamatot korai és késői fázisokra lehet felosztani, és míg az utóbbit intenzíven vizsgálták, addig az előbbiről kevés információ áll rendelkezésre. Ezért a 293T sejteket VSV pszeudotipizált HIV-1 vírusokkal transzdukáltuk, és a bekövetkező proteomikai változásokat azonnal (0 óra), 4 óra, ill. 12 óra elteltével vizsgáltuk jelölés nélküli kvantitálás segítségével.

A módszerekben ismertetett módon, a kvalitatív és kvantitatív proteomikai adatokat, valamint a String adatbázisban tárolt fehérje-fehérje interakciós adatokat felhasználva létrehoztunk egy olyan

súlyozott hálózati modellt, amely segítségével a HIV-1 hatására bekövetkező változásokat tanulmányozni tudtuk. A hálózatok esetében kiszámolt hálózati paramétereket felhasználva statisztikai elemzést végeztünk. A fő hálózatot vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a H12-ben a fehérjék száma (N) statisztikailag szignifikáns módon csökkent, utalva a bináris hálózat esetében is megfigyelhető zsugorodásra. Ennek ellenére az interakciók száma (E) és a hálózati erősség (S) nem változott statisztikailag szignifikáns módon, míg az élsűrűség (D) statisztikailag szignifikáns módon megemelkedett. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a HIV-1 transzdukciót követően 12 óra elteltével kevesebb, de egymással több kapcsolatot kialakító fehérje látja el a feladatát. Ezzel szemben a 4 órás időpontban egy kissé másabb képet láttunk: a fehérjék és a kapcsolatok száma, valamint a hálózati erősség nem változott statisztikailag szignifikáns mértékben, viszont az élsűrűség statisztikailag szignifikáns mértékben csökkent a HIV-1 transzdukciót követően. Ezeket a számolásokat elvégeztük minden funkcionális, nem funkcionális és kereszt alhálózat esetében, így megkaptuk az adott funkcionális hálózatra jellemző N_f , E_f , S_f és D_f értékeket, valamint a nem funkcionális hálózatra jellemző N_n , E_n , S_n és D_n értékeket. A funkcionális-nem funkcionális hálózatok közötti keresztkapcsolatok esetében az élek számát és az ebből származtatott paramétereket számoltuk ki, így megkaptuk az E_c , S_c és D_c paramétereket. Ezen kívül a funkcionális-nem funkcionális hálózatok közötti kapcsolatokra bevezettük a funkcionális-nem funkcionális él arányt (R). Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy mely funkcionális hálózatokhoz köthetők a főhálózaton megfigyelt változások, a funkcionális alhálózatok tanulmányozásába kezdtünk. A H4 és H12 hálózatokban kilistáztuk azokat a GO funkciókat, ahol az egyes hálózati paraméterek statisztikailag szignifikáns mértékű változást mutattak. Az volt az elképzelésünk, hogy azon funkcionális alhálózatok segítségével lehetünk képesek megmagyarázni a főhálózaton megfigyelt jelenséget, amelyek esetében statisztikailag szignifikáns változás van a funkcionális hálózati paraméterekben, és nincs statisztikailag szignifikáns mértékű változás a nem funkcionális hálózati paraméterekben.

Eredményeink alapján 4 órával a transzdukció után az általános alacsony interaktivitás ellenére bizonyos funkcionális alhálózatok, mint a virális folyamatok, protein kináz kötődés, több szervezetet érintő folyamatok, *de novo* fehérje feltekeredés, stb. statisztikailag szignifikáns mértékben megnövekedett interaktivitást mutattak. 12 órával a transzdukció után a kép változott, ugyanis a hálózat méretének csökkenése ellenére az interaktivitás nőtt, amely többek között olyan funkcionális alhálózatoknak volt tulajdonítható, mint az RNS kötés, RNS katabolikus folyamatok, virális életciklus, virális folyamatok, fehérje feltekeredés, metabolizmus, sejthalál gátlása stb. Eredményeink jó egyezést mutatnak a szakirodalomban közölt adatokkal a fertőzés korai szakaszát illetően. Ugyanakkor azt is ki kell hangsúlyozni, hogy kísérleteinket humán embrionális vesesejteken, és nem immunsejteken végeztük el. Mivel bizonyítani tudtuk, hogy a módszerünk megfelelően működik, a továbbiakban meg kívánjuk ismételni transzdukciós kísérleteinket Jurkat vagy THP-1 sejtek felhasználásával.

A munkánk során kifejlesztett súlyozott hálózatkészítő- és elemző módszer megfelelően használható biológiai minták proteómjának elemzésére, a kvalitatív és kvantitatív adatok együttes kezelésére és ezáltal hozzásegíthet a komplex biológiai jelenségek megértéséhez.

5. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

Kidolgoztam és továbbfejlesztettem több kvantitatív proteomikai és adatelemző módszert, amelyeket sikerrel alkalmaztam komplex biológiai kérdések tanulmányozására. A kidolgozott és optimalizált módszerek segítségével vizsgáltam a CaPpz1 szerepét, a PVR patomechanizmusát, a szemben zajló sebgyógyulási folyamatokat, valamint a kémiai barrier összetételét könnyben, nyálban és verejtékben. Munkám során több fehérje vizsgálatára alkalmas módszert dolgoztam ki, és potenciális biomarkereket azonosítottam nem invazív módon gyűjthető biológiai mintákból.

Vizsgálataimmal a következő új eredményeket értem el:

- Kutatótársaimmal módszert dolgoztam ki számos fehérje célzott tömegspektrometriás analízisére. A kidolgozott MRM/SRM-alapú célzott proteomikai módszerek tetszőleges biológiai mintában levő fehérjék kvalitatív és kvantitatív vizsgálatára alkalmasak.
- Megvizsgáltuk a patogén *Candida albicans* CaPpz1 protein foszfatáz hiányának a hatását a proteómra és a foszfoproteómra. Két potenciális CaPpz1 szubsztrátot azonosítottunk és felvetettük a foszfatáz szerepét a biofilm képződésben. Utóbbi hipotézisünket független kísérletekkel támasztottuk alá, és így igazoltuk a gombaspecifikus CaPpz1 enzim egy eddig még nem ismert funkcióját.
- A PVR patomechanizmusát vizsgálva kimutattuk a krisztallinokat érintő nagymértékű változásokat és igazoltuk a TG2 aktív, feltehetően védő szerepét, a PVR kialakulása során.
- Vizsgáltuk a kémiai barrier változásait patológias körülmények között és számos potenciális biomarkert azonosítottunk könnyben és nyálban:
 - potenciális könny biomarker panelt (lipokalin 1, lakritin, lizozim C, dermcidin) azonosítottunk, amely elősegítheti az Alzheimer kór diagnosztizálását
 - a preoperatív könnyben az IL5, IFN- γ és GM-CSF fehérjéket korai potenciális prediktív biomarkerként azonosítottuk, amelyek segítségével előre jelezhetők a trabekulektómia után fellépő késői komplikációk
 - megvizsgáltuk az OSCC-ben szenvedő betegektől és korban, nemben illesztett kontrolloktól származó nyálminták fehérje tartalmát, és olyan nyálfehérjéket azonosítottunk (IL-6, S100A9), amelyek potenciális biomarkerként diagnosztikus jelentőségük lehetnek a magyarországi populációban.

- Összehasonlítva a könny és csarnokvíz citokin profilját azt találtuk, hogy a két minta nem egyenértékű a gyulladásos állapot szempontjából. Adataink alapján a könny nem helyettesítheti a csarnokvizet, viszont jól alkalmazható követéses vizsgálatokra. Továbbá igazoltuk a „Proximity Extension Assay” (PEA) alkalmazhatóságát a könnyminták elemzése során.
- Információt gyűjtöttünk a szemben történő, elsősorban sclera-t érintő sebgyógyulási folyamatokról. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a késői komplikációk megjelenését előidéző legfontosabb folyamatok a sebgyógyulás korai fázisaiban történnek, amikor a gyulladásos folyamatok dominálnak. Valószínűleg a felborult pro- és antiinflammatorikus egyensúly, valamint a sebgyógyulásban szerepet játszó fehérjék mennyiségének és előfordulásának a megváltozása vezet a késői műtéti komplikációk megjelenéséhez.
- Egészséges önkéntesektől származó verejték vizsgálatával azonosítottuk a verejtékben nagy mennyiségben előforduló fehérjéket. Azt találtuk, hogy a kémiai barrier felépítésében részt vevő dermcidin, kluszterin, apolipoprotein D, prolaktin indukált fehérje és a szérum albumin alkotja az egészséges önkéntesektől származó szekretált verejték fehérjék több mint 90%-át.
- Kifejlesztettünk egy súlyozott hálózatkészítő- és elemző módszert, amely felhasználható a kvalitatív és kvantitatív adatok együttes elemzésére. A módszer segítségével információt gyűjtöttünk a HIV-1 gazdasejtbe történő bejutása után bekövetkező korai szakaszra jellemző fehérje szintű változásokról.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kifejezetten szerencsésnek érzem magam, mert kiváló emberekkel, nagy szakértelmű kutatókkal és oktatókkal kerültem kapcsolatba kutatómunkám során. Szaktudásukkal, világnézetükkel, feladatvállalásukkal és hozzáállásukkal meghatározták szemléletemet, egész kutatói pályafutásomat. Sokat tanultam tőlük, ezért szeretnék ezúton is köszönetet mondani Nekik!

Köszönöm tanárainknak a kolozsvári Babes-Bolyai Tudományegyetemen - külön kiemelve Dr. Kósa Ferencet, Dr. Tótfalusi Veress Évát és Dr. Ioan Popescut -, hogy elindítottak kutatói pályámon! Köszönetet szeretnék mondani Fésüs László akadémikus úrnak, PhD témavezetőmnek, aki mindvégig támogatott debreceni tanulmányaim során! Megtiszteltetés számomra vele dolgozni.

Külön köszönetet mondok Dr. Szabó Pálnak, aki nélkül biztosan nem készülhetett volna el ez a dolgozat! Ő volt az, aki végtelen türelemmel, humorral és óriási szakértelemmel segített elindulni a tömegspektrometriás analízisek útján. Hasonlóképpen hálás vagyok Dr. Medzihradszki Katalinnak és kutatócsoportjának, Dr. Darula Zsuzsannának, Dr. Hunyadi-Gulyás Évának és Dr. Klement Évának, akik bevezettek a proteomika és a szolgáltató laboratóriumi analízisek világába.

Köszönöm Tózsér József professzor úrnak a lankadatlan támogatást, bátorítást és a bizalmat! Nagyon sokat tanultam és folyamatosan tanulok tőle. Szerencsésnek érzem magam, hogy a vezetésével dolgozhatok.

Hálás vagyok, hogy olyan kiváló mentorokkal kerültem kapcsolatba, mint Márton Ildikó, Kiss Csongor, Rajnavölgyi Éva, Balla József és Balla György professzorok, akiktől igazán sokat tanulhattam szakmailag és emberileg egyaránt. Kiemelten köszönöm Dombrádi Viktor és Prókai László professzoroknak szakmai segítségüket és, azt is, hogy tanácsaikkal, észrevételeikkel segítettek jobbra tenni a dolgozatot. Köszönöm Pongor Ildikónak a nyelvi korrektúrát!

Külön köszönet illeti Dr. Csutak Adrienne-t, akivel együtt kezdtem el a könnyproteomikai munkákat. Köszönöm, hogy kutatóként és barátként szívvel-lélekkel mindig segített! Általa rengeteg információval lettem gazdagabb.

Köszönöm Dr. Emri Gabriellának a sok segítséget és Dr. Emri Miklósnak a tisztázó és megvilágosító beszélgetéseket, valamint az adatok elemzésében nyújtott segítséget!

Köszönöm tanítványaimnak és kollégáimnak, hogy társaim voltak a kutatómunka során, kérdéseikkel, észrevételeikkel és jelenlétükkel segítettek!

Köszönöm családomnak a végtelen sok türelmet, és bátorítást! Köszönöm, hogy kitartottak mellettem. Egy ilyen munka közös vállalkozás, még akkor is, ha ez nem mindig nyilvánvaló. Az ő támogatásuk és türelmük nélkül nem juthattam volna el ideig.

Köszönettel tartozom a Debreceni Egyetemnek, hogy befogadott, lehetőséget és teret biztosított a kutatásaimhoz.

Hálás vagyok, hogy sok olyan kutatóval kerültem kapcsolatba, akik jelenlétükkel, gondolataikkal, problémamegoldásukkal példaként álltak/állnak előttem. Sajnos e dolgozat terjedelme nem biztosít lehetőséget mindannyiuk nevének felsorolására. A kutatómunkám során kapott rengeteg támogatást és segítséget nem tudom mindenkinek viszonzni, de remélem, hogy a tanulmányaim és kutatásaim során kapott útmutatásokat a sajátjaimmal együtt, jól kamatoztatott tallérok gyanánt, továbbadhatom tanulni vágyó hallgatóknak és munkatársaknak.

A PhD fokozat megszerzése után megjelent, az értekezés készítéséhez felhasznált közlemények (11)

1. **Csősz É**, Tóth F, Mahdi M, Tsaprailis G, Emri M, Tőzsér J. Analysis of networks of host proteins in the early time points following HIV transduction. *BMC Bioinformatics*. 2019; 20:398. doi: 10.1186/s12859-019-2990-3.
2. **Csősz É**, Deák E, Tóth N, Traverso CE, Csutak A, Tőzsér J. Comparative analysis of cytokine profiles of glaucomatous tears and aqueous humour reveals potential biomarkers for trabeculectomy complications. *FEBS Open Bio*. 2019;9:1020-1028. doi: 10.1002/2211-5463.12637.
3. **Csősz É**, Tóth N, Deák E, Csutak A, Tőzsér J. Wound-Healing Markers Revealed by Proximity Extension Assay in Tears of Patients following Glaucoma Surgery. *Int J Mol Sci*. 2018;19. pii: E4096. doi: 10.3390/ijms19124096.
4. **Csősz É**[¶], Márkus B[¶], Darula Z, Medzihradszky KF, Nemes J, Szabó E, Tőzsér J, Kiss C, Márton I. Salivary proteome profiling of oral squamous cell carcinoma in a Hungarian population. *FEBS Open Bio*. 2018;8:556-569. doi: 10.1002/2211-5463.12391.
5. Márkus B, Szabó K, Pfliegler WP, Petrénny K, Boros E, Pócsi I, Tőzsér J, **Csősz É**[§], Dombrádi V[§]. Proteomic analysis of protein phosphatase Z1 from *Candida albicans*. *PLoS One*. 2017;12:e0183176. doi: 10.1371/journal.pone.0183176.
6. Márkus B, Pató Z, Sarang Z, Albert R, Tőzsér J, Petrovski G[§], **Csősz É**[§]. The proteomic profile of a mouse model of proliferative vitreoretinopathy. *FEBS Open Bio*. 2017 ;7:1166-1177. doi: 10.1002/2211-5463.12252.
7. **Csősz É**[¶], Lábiscsák P[¶], Kalló G, Márkus B, Emri M, Szabó A, Tar I, Tőzsér J, Kiss C, Márton I. Proteomics investigation of OSCC-specific salivary biomarkers in a Hungarian population highlights the importance of identification of population-tailored biomarkers. *PLoS One*. 2017;12:e0177282. doi: 10.1371/journal.pone.0177282.
8. **Csősz É**, Kalló G, Márkus B, Deák E, Csutak A, Tőzsér J. Quantitative body fluid proteomics in medicine - A focus on minimal invasiveness. *J Proteomics*. 2017;153:30-43. doi: 10.1016/j.jprot.2016.08.009.
9. Kalló G, Emri M, Varga Z, Ujhelyi B, Tőzsér J, Csutak A, **Csősz É**. Changes in the Chemical Barrier Composition of Tears in Alzheimer's Disease Reveal Potential Tear Diagnostic Biomarkers. *PLoS One*. 2016;11:e0158000. doi: 10.1371/journal.pone.0158000.
10. Kalló G, Chatterjee A, Tóth M, Rajnavölgyi É, Csutak A, Tőzsér J, **Csősz É**. Relative quantification of human β -defensins by a proteomics approach based on selected reaction monitoring. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2015 ;29:1623-31. doi: 10.1002/rcm.7259.

11. **Csősz É**, Emri G, Kalló G, Tsaprailis G, Tőzsér J. Highly abundant defense proteins in human sweat as revealed by targeted proteomics and label-free quantification mass spectrometry. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29:2024-31. doi: 10.1111/jdv.13221.

[¶]Megosztott első szerzők, [§]Megosztott utolsó szerzők

PhD fokozat megszerzése után megjelent, a tézisek készítéséhez fel nem használt közlemények (28)

1. Posta N, **Csősz É**, Oros M, Pethő D, Potor L, Kalló G, Hendrik Z, Sikura KÉ, Méhes G, Tóth C, Posta J, Balla G, Balla J (2020) Hemoglobin oxidation generates globin-derived peptides in atherosclerotic lesions and intraventricular hemorrhage of the brain, provoking endothelial dysfunction. *Laboratory Investigation*, 1-17.
2. Steckel A, Uray K, Kalló G, **Csősz É**, Schlosser G (2020) Investigation of neutral losses and the citrulline effect for modified H4 N-terminal pentapeptides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 31, 565-573.
3. Márton IJ, Horváth J, Lábiscsák P, Márkus B, Dezső B, Szabó A, Tar I, Piffkó J, Jakus P, Barabás J, Barabás P, Olasz L, Kövér Z, Tőzsér J, Sándor J, **Csősz É**, Scholtz B, Kiss C (2019) Salivary IL-6 mRNA is a Robust Biomarker in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Medicine* 8, 1958.
4. Simon Á, Gulyás G, Mészár Z, Bhide M, Oláh J, Bai P, **Csősz É**, Jávora A, Komlósi I, Remenyik J, Czeglédi L (2019) Proteomics alterations in chicken jejunum caused by 24 h fasting. *PeerJ* 7, e6588
5. Virga J, Bognár L, Hortobágyi T, **Csősz É**, Kalló G, Zahuczki G, Steiner L, Hutóczki G, Reményi-Puskár J, Klekner Á (2018) The Expressional Pattern of Invasion-Related Extracellular Matrix Molecules in CNS Tumors. *Cancer Investigation* 36, 492-503.
6. Gulyás G, Pohoczky K, Csősz É, Simon Á, Jávora A, Czeglédi L (2018) Comparative proteome analysis of skeletal muscle between Merino and Tsigai lambs. *Small Ruminant Research* 158, 35-41.
7. Virga J, Bognár L, Hortobágyi T, Zahuczky G, **Csősz É**, Kalló G, Tóth J, Hutóczki G, Reményi-Puskár J, Steiner L, Klekner Á (2018) Tumor Grade versus Expression of Invasion-Related Molecules in Astrocytoma. *Pathol Oncol Res*. 24(1):35-43.
8. Virga J, Szemcsák CD, Reményi-Puskár J, Tóth J, Hortobágyi T, **Csősz É**, Zahuczky G, Szivos L, Bognár L, Klekner Á. (2017) Differences in Extracellular Matrix Composition and its Role in Invasion in Primary and Secondary Intracerebral Malignancies. *Anticancer Res*. 37:4119-4126. doi: 10.21873/anticancer.11799.

9. Kecskeméti Á, Nagy C, **Csősz É**, Kalló G, Gáspár A (2017) The application of a microfluidic reactor including spontaneously adsorbed trypsin for rapid protein digestion of human tear samples. *Proteomics Clin Appl.* 11(11-12):1-9.
10. Kecskeméti A, Bakó J, Csarnovics I, **Csősz É**, Gáspár A (2017) Development of an enzymatic reactor applying spontaneously adsorbed trypsin on the surface of a PDMS microfluidic device. *Anal Bioanal Chem.* 409:3573-3585.
11. **Csősz É**, Deák E, Kalló G, Csutak A, Tőzsér J (2017) Diabetic retinopathy: Proteomic approaches to help the differential diagnosis and to understand the underlying molecular mechanisms. *J Proteomics* 150:351-358.
12. Tarapcsák S, Szalóki G, Telbisz Á, Gyöngy Z, Matúz K, **Csősz É**, Nagy P, Holb IJ, Rühl R, Nagy L, Szabó G, Goda K (2017) Interactions of retinoids with the ABC transporters P-glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein. *Sci Rep.* 7:41376.
13. Virga J, Bognár L, Hortobágyi T, Zahuczky G, **Csősz É**, Kalló G, Tóth J, Hutóczki G, Reményi-Puskár J, Steiner L, Klekner Á (2017) Prognostic Role of the Expression of Invasion-Related Molecules in Glioblastoma. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg.* 78:12-19.
14. Gulyás G, **Csősz É**, Prokisch J, Jávör A, Mézes M, Erdély M, Balogh K, Janáky T, Szabó Z, Simon Á, Czeglédi L (2017) Effect of nano-sized, elemental selenium supplement on the proteome of chicken liver, *Journal of Animal Physiology and Nutrition* 101:502-510.
15. Csomós K, Kristóf E, Jakob B, Csomós I, Kovács G, Rotem O, Hodrea J, Bagoly Z, Muszbek L, Balajthy Z, **Csősz É**, Fésüs L (2016) Protein cross-linking by chlorinated polyamines and transglutamylation stabilizes neutrophil extracellular traps. *Cell Death Dis.* 7:e2332.
16. Hutóczki G, Bognár L, Tóth J, Scholtz B, Zahuczky G, Hanzély Z, **Csősz É**, Reményi-Puskár J, Kalló G, Hortobágyi T, Klekner Á (2016) Effect of concomitant radiochemotherapy on invasion potential of glioblastoma, *Pathol Oncol Res.* 22:155-160.
17. Klekner Á, Hutóczki G, Virga J, Reményi-Puskár J, Tóth J, Scholtz B, **Csősz É**, Kalló G, Steiner L, Hortobágyi T, Bognár L (2015) Expression pattern of invasion-related molecules in the peritumoral brain, *Clin Neurol Neurosurg.* 139:138-43.
18. Gulyás G, Czeglédi L, Béri B, Harangi S, **Csősz É**, Szabó Z, Janáky T, Jávör A (2015) Proteomic analysis of skeletal muscle at different live weights in Charolais bulls. *Acta Alimentaria: an International Journal of Food Science* 44:132-138.
19. Alvarado G, Jeney V, Tóth A, **Csősz É**, Kalló G, Huynh T A, Hajnal Cs, Kalász J, Pásztor T E, Édes I, Gram M, Akerström B, Smith A, Eaton W J, Balla Gy, Papp Z, Balla J (2015) Heme-induced contractile dysfunction in human cardiomyocytes caused by oxidant damage to thick filament proteins, *Free Radical Biology and Medicine* 89:248-262.

20. Török Zs, Pető T, **Csősz É**, Tukacs E, Molnár A M, Berta A, Tőzsér J, Hajdu A, Nagy V, Domokos B, Csutak A (2015) Combined Methods for Diabetic Retinopathy Screening, Using Retina Photographs and Tear Fluid Proteomics Biomarkers. *Journal of Diabetes Research* 2015:1-8.
21. Csutak A, Török Zs, **Csősz É**, Pető T (2014) Látásmentő új szűrés. *Term. Vil.* 145, 207-210.
22. Gulyás G, Czeglédi L, Prokisch J, **Csősz É**, Szabó Z, Janáky T, Jávora A (2014) Effect of selenium supplement on proteome of chicken egg white and yolk. *Lucrari Stiintifice Zootehnie si Biotehnologii / Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies* 47:83-88.
23. Török Zs, Pető T, **Csősz É**, Tukacs E, Molnár A, Maros-Szabó Z, Berta A, Tőzsér J, Hajdu A, Nagy V, Domokos B, Csutak A (2013) Tear fluid proteomics multimarkers for diabetic retinopathy screening. *BMC Ophthalmol.* 13:1-8.
24. Palicz Z, Jenes A, Gáll T, Misztai-Blasius K, Kollár S, Kovács I, Emri M, Márián T, Leiter E, Pócsi I, **Csősz É**, Kalló G, Hegedűs C, Virág L, Csernoch L, Szentesi P (2013) In vivo application of a small molecular weight antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF). *Toxicol Appl Pharmacol.* 269:8-16.
25. **Csősz É**, Boross P, Csutak A, Berta A, Tóth F, Póliska Sz, Török Zs, Tőzsér J (2012) Quantitative analysis of proteins in the tear fluid of patients with diabetic retinopathy. *J Proteomics* 75:2196-2204.
26. Simon-Vecsei Z, Király R, Bagossi P, Tóth B, Dahlbom I, Caja S, **Csősz É**, Lindfors K, Sblattero D, Nemes E, Mäki M, Fésüs L, Korponay-Szabó IR (2012) A single conformational transglutaminase 2 epitope contributed by three domains is critical for celiac antibody binding and effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:431-436.
27. Gulyás G, Béri B, Jávora A, Márk L, **Csősz É**, Pohóczky K, Soltész B, Kuti D, Czeglédi L (2012) Holstein-fríz tehének hosszú hasznos élettartamának vizsgálata proteomikai módszerekkel. *Agrártudományi Közlemények / Acta Agraria Debreceniensis*, 48: 21-25.
28. Király R, **Csősz É**, Kurtán T, Antus S, Szigeti K, Simon-Vecsei Z, Korponay-Szabo IR, Keresztessy Zs, Fésüs L (2009) Functional significance of five noncanonical Ca²⁺-binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site-directed mutagenesis. *FEBS J* 276: 7083-7096.

PhD fokozat megszerzéséhez felhasznált közlemények (5)

1. **Csősz É**, Meskó B, Fésüs L (2009) Transdab wiki: the interactive transglutaminase substrate database on web 2.0 surface. *Amino Acids* 36:615-617.
2. **Csősz É**, Bagossi P, Nagy Z, Dosztányi Z, Simon I, Fésüs L (2008) Substrate preference of transglutaminase 2 revealed by logistic regression analysis and intrinsic disorder examination. *J Mol Biol.* 383:390-402.

3. Keresztessy Z, **Csősz É**, Hársfalvi J, Csomós K, Gray J, Lightowlers RN, Lakey JH, Balajthy Z, Fésüs L (2006) Phage Display Selection of Efficient Glutamine-donor Substrate Peptides For Transglutaminase 2. Protein Sci. 15:2466-2480.
4. **Csősz É**, Keresztessy Zs, Fésüs L (2002) Transglutaminase substrates: from test tube experiments to living tissues. Minerva Biotechnologica 14:149-153.
5. Nemes Z, Petrovski G, **Csősz É**, Fésüs L (2005) Structure-function relationship of transglutaminase-a contemporary view. In: Mehta K, Eckert R (szerk.) Transglutaminases. Prog. Exp. Tum Res. Basel, Karger, 38:19-36.

Könyvek/könyvfejezetek (6):

1. **Csősz É**, Gulyás G: Proteomikai metodikák az élelmiszervizsgálatban. Debrecen: Debreceni Egyetem, 76 p., 2015. (ISBN:978-963-473-922-7)
2. Czeglédi L, Gulyás G, **Csősz É**: Proteomika az élelmiszer-előállításában. Debrecen: Debreceni Egyetem, 94 p., 2015. (ISBN:978-963-473-921-0)
3. Emri T, **Csősz É**, Tőzsér J: Fehérjebiotechnológia. Digitális Tankönyvtár, Debrecen, 124 p., 2011.
4. Aradi J, Balajthy Z, **Csősz É**, Scholtz B, Szatmári I, Tőzsér J, Varga T: Molekuláris terápiák. Debreceni Egyetem, Debrecen, 112 p., 2011.
5. Aradi J, Balajthy Z, **Csősz É**, Scholtz B, Szatmári I, Tőzsér J, Varga T: Molecular therapies. Digitális Tankönyvtár, Debrecen, 120 p., 2011.
6. Emri T, **Csősz É**, Tőzsér J.: Protein Biotechnology. Digitális Tankönyvtár, Debrecen, 124 p., 2011.

Szabadalmak (2):

1. Korponay-Szabó IR, Fésüs L, Bagossi P, Csősz É, Király R, Simon-Vecsei Z, Mäki M, Diagnosis of gluten-induced autoimmune diseases. Nemzetközi. 2010.
2. Korponay-Szabó IR, Fésüs L, Bagossi P, Csősz É, Király R, Simon-Vecsei Z, Mäki M, Diagnosis and treatment of gluten-induced autoimmune diseases. Nemzetközi. 2010.

Tudománymetriai értékek:

Folyóiratcikkek száma és impakt faktora: 43 (IF: 124,3)

Első szerzős közlemények száma és impakt faktora: 13 (IF: 40,644)

Utolsó szerzős közlemények száma és impakt faktora: 4 (IF: 9,757)

PhD fokozat megszerzéséhez felhasznált közlemények száma és impakt faktora: 5 (IF: 15,916)

Tankönyvek/oktatási anyagok száma: 10

Hivatkozások száma: 574, ebből független: 476, Hirsch-index: 14 (MTMT)