

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**KORSZERŰ ANALITIKAI MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA
A PEPTID- ÉS FEHÉRJEKUTATÁSBAN**

JANÁKY TAMÁS

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ORVOSI VEGYTANI INTÉZET
SZEGED
2011

TARTALOMJEGYZÉK

1.	Előszó.....	2
2.	Bevezetés.....	3
3.	Célkitűzések.....	8
4.	Az eredmények összefoglalása	11
5.	Kiemelkedő tudományos eredmények.....	20
6.	Eredmények gyakorlati hasznosíthatósága	21
7.	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	23

1. ELŐSZÓ

Az analitikai kémia egyik fő feladata, hogy a társtudományok számára újabb és újabb, érzékenyebb, specifikusabb, gyorsabb, egyszerűbb és olcsóbb analitikai eljárásokat, módszereket fejlesszen ki és elősegítse azok fejlődését.

Mindeddig az orvostudomány közelében dolgoztam, így érthető, hogy a disszertációban bemutatott eredmények néhány kivételével valamilyen módon kapcsolódnak az gyógyításhoz. Kezdetben endokrinológiai betegségek diagnosztizálásához szteroid-, peptid- és fehérje-hormonokat határoztam meg radioimmunassay-vel, diagnosztikus és tumorelles peptideket állítottam elő, peptidek és fehérjék analíziséhez folyadékkromatográfiás, elektroforetikus, tömegspektrometriás és proteomikai módszereket fejlesztettem ki, hepatitis B vírus és placenta fehérjéinek szerkezetét határoztam meg, emberi táplálkozásban használt gabonafélékben allergén fehérjét mutattam ki, gyógyszerkutatói céllal lehetséges fehérjecélpontokat jelöltünk ki, ill. gyógyszer mellékhatást vizsgáltunk, a betegség mögött álló molekuláris folyamatokat derítettünk fel, és végül az Alzheimer-kórral kapcsolatosan végeztünk alapkutatói jellegű vizsgálatokat.

Köszönhetően az innovatív és progresszív munkahelyi környezetnek, számos új analitikai eljárást vezethettem be Magyarországon, ill. vettem részt azok itthoni bevezetésében. Így mi állítottunk elő először szteroid- és peptidhormonok meghatározására szolgáló reagenseket és használtuk azokat a klinikai diagnosztikához, ill. kutatói feladatainkhoz. Már 1978-ban összeállítottam egy HPLC készüléket és használtam eredményesen peptidek analíziséhez. Munkatársaimmal együtt 1980-ban szintetikus peptidek preparatív tisztítását és ellenőrzését végeztük nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával. 1993-ban peptideket és fehérjét analizáltam kapilláris elektroforézissel. Kapilláris HPLC oszlopokat 1995-ben elsőként én készítettem és alkalmaztam peptidek vizsgálatához. Magyarországon

kutatócsoportom használta először a tömegspektrometriát természetes és szintetikus peptidok széleskörű vizsgálatához. Laboratóriumomhoz köthető a posztgenom éra új tudományterületének, a proteomikának magyarországi meghonosítása, az első proteomikai fehérjeazonosítások. Lehetőségeink szélesebb körű hasznosítása érdekében sok kooperációt alakítottam ki más területeken dolgozókkal, így kerülhetett a disszertációba számos egymástól távol eső tudományos eredmény, a lucernától kezdve, a talajlakó baktériumokon, fonalférgeken, sejtenyészeteken és egereken végzett kísérleteken keresztül humán mintákból származó adatok.

A disszertáció három részből áll, melyeket a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával, kapilláris és gélelektroforézissel, valamint tömegspektrometriával végzett peptid és fehérjeanalitikai munka köt össze. Eredményeimet többségében nem egyedül, hanem csoportban végzett munkával értem el. Így pl. a peptideket, a citotoxikus LH-RH-analógok kivételével nem én szintetizáltam, de tisztításuk és minőségellenőrzésük, az eredmények értékelése engem minősít. A biológiai kísérletek kivitelezése sem az én munkám volt, mindenhol „csak” az analitikai vizsgálatok és értékelésük köthetők nevemhez, ill. később kutatócsoportomhoz.

2. BEVEZETÉS

Nagyhatékonyságú elválasztástechnikai módszerek

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography) elválasztástechnikai eljárás, amely lehetővé teszi legkülönbözőbb vegyületek gyors és érzékeny analízisét, keverékek komponenseinek elválasztását, azonosítását, mennyiségi meghatározását és tiszta állapotban történő kinyerését. A HPLC legjellemzőbb tulajdonsága és legfőbb erénye a kiváló felbontóképesség, ami által a szerkezetileg a még nagyon hasonló szerkezettel rendelkező vegyületek egymástól jobban

elválaszthatók, megkülönböztethetők. A módosított felületű állófázisok (pl. fordított fázisok) bevezetése kibővítette a HPLC alkalmazhatóságát megnyitva az utat a poláris, vízdoldható anyagok, közöttük a peptidek és fehérjék analízise, a bioanalitika felé.

A természetben újonnan felfedezett és izolált rendkívül nagy hatékonyságú (már nano-, piko-, ill. femtomólos koncentrációban hatásos) biológiailag aktív peptidek nagy száma, azok karakterizálása és biológiai funkcióinak megismerése ugrásszerűen megnövelte a keresletet jól definiált minőségű peptidek, analógjaik és fragmenseik iránt. A peptidekkel végzett biológiai, biokémiai, orvosi kutatások kiterjedése, a szerkezet-hatás összefüggések, a hormon-receptor kölcsönhatások, enzim-szubsztrát-inhibitor rendszerek, antigén-antitest kölcsönhatások tanulmányozása, a fehérjék antigén-determináns helyeinek (epitópok) felderítése és modellezése, peptid alapú gyógyszerek gyártása további, egyre növekvő igényt támasztott egyrészt a peptidszintézissel, másrészt a peptidek tisztításának hatékonyságával, sebességével és a termék tisztaságával szemben. A szilárdfázisú peptidszintézis alkalmazásával jelentősen felgyorsult a peptidek előállítása, míg a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia kialakulásával és a peptidkémiai laboratóriumokban történő bevezetésével elhárult (helyesen: inkább csökkent) az akadály a nagy tisztaságú szintetikus peptidek gyors előállítása előtt.

A szilárdfázisú peptidszintézis során az előállítandó peptid méretétől és szekvenciájától függően különböző minőségű és mennyiségű melléktermék képződik, amelyek gyakran a termékhez hasonló polaritásúak, nagyságúak és hidrofóbicitásúak, ezért kromatográfiás tulajdonságaik is nagyon hasonlóak. A peptidek tisztaságának, ill. a szennyezésprofiljának a felderítéséhez eltérő szelektivitású, nagy hatékonyságú és lehetőleg ortogonális elválasztástechnikai módszerekre van szükség. A kapilláris elektroforézis (CE) kiváló alternatívának bizonyult a különböző típusú HPLC-s elválasztások mellett. Ez annak köszönhető, hogy a kapilláris elektroforézisben az elválasztás más elveken

alapszik, gyors, egyszerű, könnyen automatizálható, mennyiségi elemzésre is használható, de mindenekelőtt nagyhatékonyságú módszer vízzel oldható kis mennyiségű peptidok, fehérjék kis térfogatban történő elválasztására.

A nagyhatékonyságú elválasztási módszerek, de különösen a HPLC bevezetése a peptid- és fehérjekutatásba forradalmasította a biológiai tudományokat, (viszonylag) egyszerű módon lehetővé téve ezen biopolimerek gyors és hatékony elválasztását, érzékeny detektálását, azonosítását és kvantitatív meghatározását.

Tömegspektrometria; a tömegspektrometria és az elválasztástechnika kombinálása

A tömegspektrometria (MS) műszeres analitikai eljárás töltéssel rendelkező anyagi részecskék tömegének, helyesebben tömeg/töltés arányának (m/z) meghatározására. Felhasználható atomok, molekulák tömegének, vegyületek elemi összetételének, keverékek összetevőinek mennyiségi és minőségi meghatározására, valamint molekulák szerkezetének felderítésére. A tömegspektrometria ma vitathatatlanul egyike a legsokoldalúbb analitikai eljárásnak: túl azon, hogy a kémia majdnem minden ágában használatos, köszönhetően az utóbbi két évtizedben a műszerek és a módszerek területén bekövetkezett óriási fejlődésnek, a biológia, az orvostudomány és az anyagtudományok területén is nélkülözhetetlen módszerré vált.

A nagyobb molekulatömegű, poláris vagy hőérzékeny minták, pl. a biomolekulák, biopolimerek (peptidok, fehérjék, nukleotidok, nukleinsavak stb.) tömegspektrometriás analízise csak a „lágy” ionizációs technikák (elektrospray ionizáció (ESI), mátrix-segítette lézer deszorpciós ionizáció (MALDI)) megjelenésével vált lehetővé. Túl azon, hogy tömegspektrometriával a peptidok és fehérjék molekulatömege pontosan megmérhető, lehetőség van azok szekvenciájának meghatározására is. Peptidok és fehérjék tömegspektrometriás fragmentációját fel lehet használni a peptid/fehérje azonosítására, *de novo*

szekvenálására, poszt-transzlációs és egyéb kovalens módosítások azonosítására és lokalizálására.

A biopolimerek analízisében az igazi áttörés akkor következett be, amikor a két, külön-külön is kiemelkedő képességű analitikai módszert, a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát és a tömegspektrometriát sikerült összekapcsolni (LC-MS). A kombinált módszer nagyszerűsége abban rejlik, hogy a hasonló vagy azonos retenciós tulajdonságokkal rendelkező mintakomponenseket különböző tömegspektrumuk alapján differenciálni tudja. NanoESI, microESI ionforrásokkal nő a detektálás érzékenysége, különösen akkor, ha hasonló dimenzióban működő elválasztástechnikai rendszert, nanoLC-t, kapilláris LC-t vagy kapilláris elektroforetikus készüléket kapcsolunk hozzá.

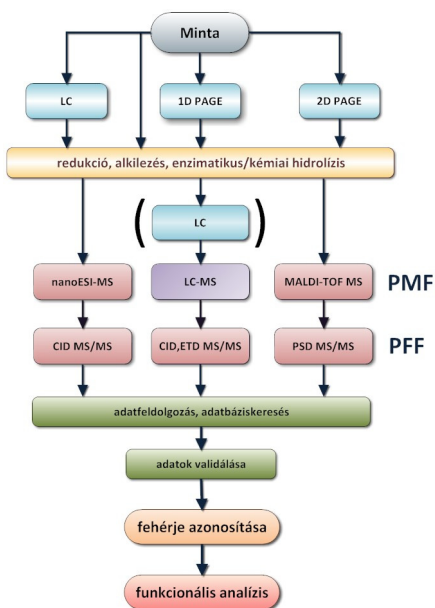
Proteomika

A proteomika a proteomot alkotó fehérjék átfogó minőségi és mennyiségi analízisével, valamint funkcióinak megismerésével foglalkozó tudományág. Az életfolyamatokat fehérjék vezérlik, ezért ahhoz, hogy molekuláris szinten megértjük, mi is történik valójában a sejtekben, mindenképpen meg kell ismerni az egy adott pillanatban jelenlévő fehérjék mennyiségét és aktivitását, kölcsönhatásait, valamint azok kritikus poszt-transzlációs módosításait, amelyek szabályozzák a fehérjék aktivitását is.

A proteomikának több különálló, de bizonyos aspektusaiban átfedő ága alakult ki, melyek együttműködése segíthet megérteni a proteom, ill. a biológiai rendszer működését. Így beszélünk szerkezeti, expressziós, kölcsönhatási és funkcionális proteomikáról. Attól függően, hogy milyen módszerekkel érjük el a kitűzött cél, szintén többféle proteomikáról beszélünk. Munkám során tömegspektrometria-alapú és affinitási kölcsönhatás-alapú (fehérje-chip) módszereket használtam. A tömegspektrometria-alapú proteomika létrejöttét három tudományterület: az elválasztástechnika, a tömegspektrometria és a bioinformatika robbanásszerű fejlődése tette lehetővé. Az 1. ábrán a

tömegspektrometriás fehérjeazonosítás folyamatábráját látható, amely bemutatja az elektroforetikus, kromatográfiás és a különböző tömegspektrometriás módszerek kombinálásának lehetőségeit, amelyet magam is végigpróbáltam.

Az alapvető életfolyamatok molekuláris szintű megértéséhez, a rendszerbiológia kiteljesüléséhez szolgáltatott alapkutatási eredményeken túl a proteomika biomarkerek felfedezésével segítséget nyújthat a betegségek korai diagnózisában, gyógyszercélpontok kijelölésében, betegségek előrehaladásának megismerésében, gyógyszeres terápia hatásának nyomon követésében, a gyógyszerek hatásmechanizmusának és mellékhatások okainak felderítésében, a növényélettani folyamatok megismerésével pl. mezőgazdasági terméseredmények fokozásában, allergén fehérjéket tartalmazó növények kiszűrésével stb.



1. ábra
A proteomika folyamatábrája

3. CÉLKITŰZÉSEK

Fő célom annak vizsgálata volt, hogy a nagyhatékonyságú elválasztástechnikai módszerek, a tömegspektrometria és a proteomika hogyan segítik biopolimerek (peptidek, fehérjék) előállítását, minősítését, fiziko-kémiai és biológiai tulajdonságainak vizsgálatát, biokémiai folyamatok tisztázását, fehérjék azonosítását, betegségek hátterének felderítését és a gyógyszerkutatást.

1. Caerulein és skorpiótoxinok szintézisének optimalizálása HPLC kontroll mellett; a preparatív kromatográfiás tisztításuk és minőségellenőrzésük nagyhatékonyságú elválasztási módszerekkel.
2. Szintetikus galanin analógok és fragmensek preparatív kromatográfiás tisztítása, minőségellenőrzése nagyhatékonyságú elválasztási módszerekkel, fizikai-kémiai paraméterek vizsgálata nagyhatékonyságú elválasztási eljárásokkal.
3. Foszforilált peptidek előállítása, tisztaságvizsgálata és kinázok aktivitásának meghatározása kapilláris elektroforetikus módszerekkel.
4. Tumorelles hatással rendelkező luteinizálóhormon-felszabadító hormon analógok (LH-RH) szintézise, biológiai tulajdonságaik vizsgálata.
5. Kapilláris kromatográfiás oszlopok, statikus és dinamikus nanoESI ionforrások, valamint CE-MS interface tervezése és elkészítése.
6. „Immobilizált mesterséges membrán”-kromatográfia online tömegspektrometriás detektálásának (IAMC-MS) kifejlesztése gyógyszerjelöltek analízisére.
7. Kombinatorikus könyvtárak összetételének, potenciális gyógyszer-jelöltek farmakokinetikai paramétereinek tömegspektrometriás meghatározása.
8. Annak megvizsgálása, hogy a hipofízis hátsó lebenyében történik-e hormonjainak (oxitocin és a vazopresszin) szintézise.

9. Meg kívántuk határozni, hogy vajon a neuroproteomikai célú állatkísérletekben az állatok genetikai hátterének van-e befolyása az agy fehérje-összetételére?
10. Az 1D és 2D poliakrilamid-gélelektroforézissel elválasztott fehérjék mennyiségi meghatározása „label-free” MS módszerrel.
11. Gabonafélék és pszeudocereálék patogénekkel-kapcsolatba hozható (pathogen-related, PR) és allergén fehérjeinek feltérképezése, azonosítása.
12. Biokémiai kutatások segítése proteomikai vizsgálatokkal:
lucerna ciklin-függő kinázának, *Streptomyces griseus* faktor-C fehérjeinek, *Caenorhabditis elegans* transzglutamináz enzim szubsztrátjának, humán placentafehérjék és a Rli1 riboszómális fehérje kölcsönható partnereinek és a hideg elleni védekezésben szerepet játszó fehérjék proteomikai azonosítása, azok szerepének vizsgálata.
13. Diszulfidhíd-mintázat megállapítása a Hepatitis B vírus X-fehérjéjében; az ellene termelt monoklonális antitestek specificitásának meghatározásához epitóp-térképezéssel.
14. A szorongás egy új állatmodelljében a kísérleti állatok agyának proteomikai vizsgálatával meg kívántuk határozni azokat a folyamatokat, amelyek részt vesznek a betegség kialakulásában.
15. Kissejtes tüdőcarcinóma sejtenyészeten, ill. *in vivo* is tumorellenes hatással rendelkező peptidszármazékok kölcsönható partnereinek proteomikai azonosításával meg akartuk határozni azon molekuláris célpontokat, amelyeken keresztül hatásukat kifejtik.
16. A gyógyszerkutatáshoz tartozik a gyógyszerek mellékhatásainak vizsgálata, magyarázata is. Így választ kerestünk arra, hogy a nukleozid analógokkal (HIV gyógyszerek) történő gyógykezelés miért és hogyan vezethet kardiomiopátia kialakulásához.

17. Az A β 1-42 (amiloid) peptid kulcsszerepet játszik az Alzheimer-kór patológiájában. A betegség hátterében zajló molekuláris folyamatok tisztázásához tömegspektrometriás módszerek és fehérje-chip alkalmazásával meg kívántuk határozni a peptiddel kölcsönható fehérjéket.

Azt, hogy az A β 1-42 miként, milyen biokémiai folyamatokat megzavarva fejt ki citotoxikus hatását, sejtenyészetekkel végzett proteomikai vizsgálatokkal kívántuk tanulmányozni.

18. Az ösztrogének állatmodellekben szignifikáns védőhatást mutatnak az Alzheimer-kór kifejlődésével szemben. Célunk ennek a folyamatnak molekuláris szintű felderítése volt, melyet proteomikai fehérjeanalízissel kívántunk megoldani.

4. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Módszert dolgoztunk ki caerulein peptid „nagy” tételben történő szintézisére, melynek követéséhez, preparatív tisztításhoz és minőségellenőrzéséhez folyadékkromatográfiás és kapilláris elektroforetikus eljárásokat fejlesztettem ki.

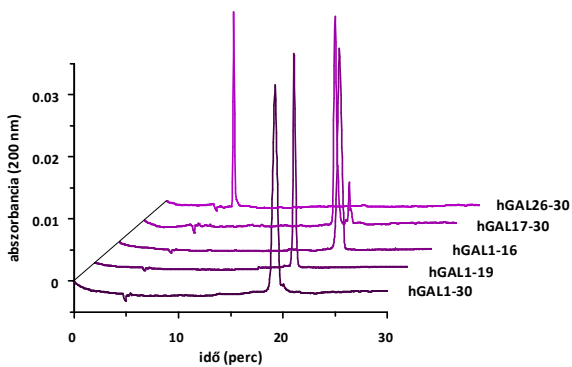
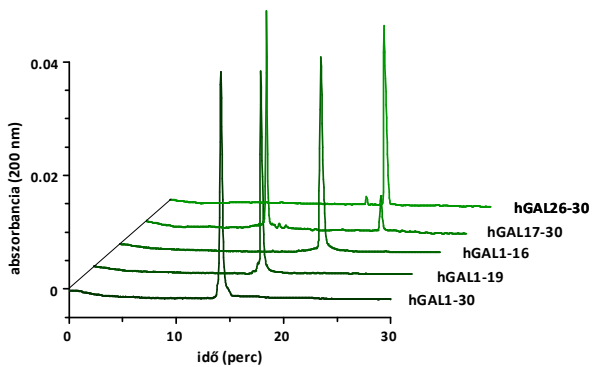
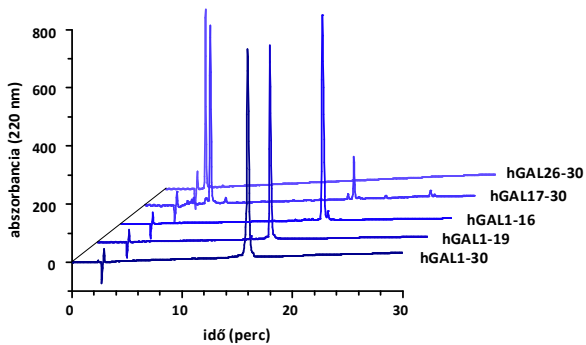
Kidolgoztuk a több diszulfidhidat tartalmazó peptidek (skorpióméreg charybdotoxin és iberiotoxin) optimális gyűrűzárási reakciójához legjobban illő preparatív HPLC tisztítás körülményeit. A peptidek tisztaságát két ortogonális módszerrel ellenőriztem.

2. Megoldottuk a humán, csirke, patkány és sertés galaninok és fragmenseik szilárdfázisú szintézise utáni HPLC tisztítását. A peptidek tisztaságellenőrzése során tapasztaltam, hogy a kapilláris elektroforézis kiegészítő módszere az RP-HPLC-nek (2. ábra). A kapilláris elektrokinetikus kromatográfia különösen könnyen használható, gazdaságosabb és kevesebb hulladékoldószert termelő alternatívája lehet HPLC-nek.

Megállapítottam, hogy a galanin peptidek RP-HPLC-s retenciós ideje is arányos azok számolt hidrofóbicitásával, így használható új peptidek retenciójának előrejelzésére, de csak rövidebb, magasabb rendű szerkezettel nem rendelkező peptidek esetén.

Azt találtam, hogy a peptidek ionizációs tulajdonságainak ismeretében az optimális kapilláris elektroforetikus módszerek körülményi előre tervezhetők.

3. Nagyhatékonyságú elválasztástechnikai eljárásokat dolgoztam ki a TCR/CD3 fehérjekomplex szintetikus fragmenseinek, ill. foszfopeptidjeinek tisztaságellenőrzésére. Megállapítottam, hogy a micelláris elektrokinetikus kromatográfia kitűnően alkalmazható foszfopeptidek vizsgálatára.



2. ábra

Humán galanin és fragmenseinek analitikai HPLC (fenn) és MEKC (lenn) kromatogramjai és CZE elektroferogramjai (középen)

Kimutattam, hogy a TCR/CD3 ζ -láncának konzervált régiójából 6 peptid szubsztátja az *src* kinázoknak.

4. Új, citotoxikus csoportot tartalmazó LH-RH agonista (17 db) és antagonist (17 db) decapeptidet állítottam elő (3. ábra), melyek közül számos, antrakinon-származékot, metotrexátot, ciklopropil-csoportot tartalmazó analóg emlő- és prosztatacarcinóma sejtvonalakon, ill. *in vivo* is jelentős tumorelles hatással rendelkezik.

A: Glp-His-Trp-Ser-R⁵-R⁶(AX)-Leu-Arg-Pro-Gly-CONH₂

B: Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4Cl)-R³-Ser-R⁵-R⁶(AX)-Leu-Arg-Pro-D-Ala-CONH₂

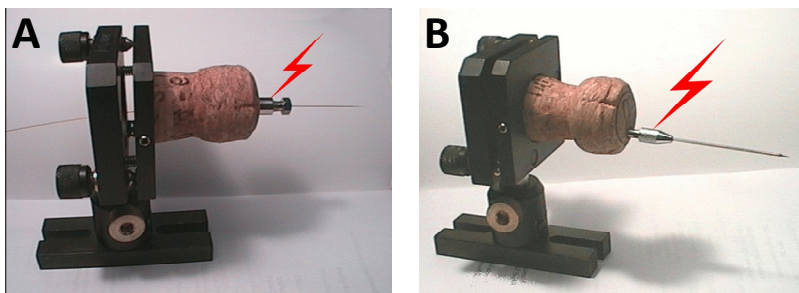
C: R1-Ser-Tyr-R⁴(AX)-Leu-Arg-ProNH-Et

3. ábra

Citotoxikus csoportot tartalmazó agonista (**A**), antagonist (**B**) hatású teljes hosszúságú, ill. rövidített (**C**) LH-RH analógok általános szerkezete, ahol R¹: acetyl, acetyl-Trp, indolilacetyl, R³: D-Trp, D-Pal(3), R⁴ és R⁶: D-Lys, D-Orn szubsztituált származékai (AX) R⁵: Tyr, Arg

Rövidített hexa- és heptapeptid analógok (21 db) is kötődnek a hormon receptorához és emlőcarcinóma sejtvonalon tumornövekedést gátló hatással rendelkeznek.

5. A nagy érzékenységű kapilláris LC-MS mérésekhez kapilláris HPLC és CEC oszlopokat készítettem és kifejlesztettünk egy statikus és egy dinamikus nano- és mikroESI tömegspektrometriás ionforrásokat (4. ábra). Segítségükkel Magyarországon először végeztem kapilláris LC-MS vizsgálatokat, valamint elsőként készítettem nanoESI-MS spektrumokat. Hasonló szerkezetű peptidek elválasztására és TFA-mentesítésére CE-MS és CEC-MS módszereket fejlesztettünk ki és sikeresen alkalmaztuk azokat.



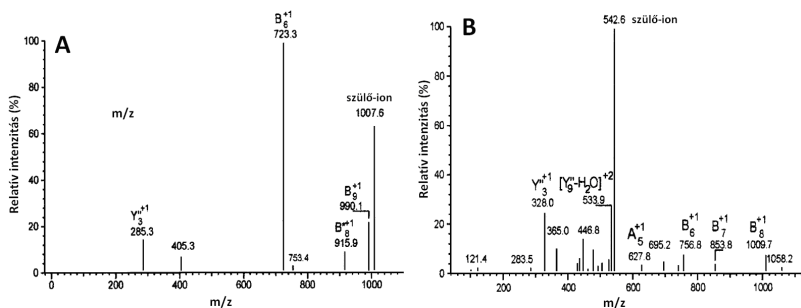
4. ábra

Laboratóriumunkban készült A: dinamikus és B: statikus nano-elektrospray ionforrások

6. IAMC-MS rendszert dolgoztunk ki vegyületek foszfolipofilicitásának gyors meghatározására. Az új módszer lehetővé teszi több vegyület MS-detektálással történő egyidejű analízisét. Sikeresen alkalmaztuk az eljárást danzilezett tripeptid-analógok foszfolipofilicitásának meghatározására.
7. Potenciális gyógyszerjelöltek kutatásához elkészített peptidkönyvtárak vizsgálatára MS, LC-MS és LC-MS/MS módszereket fejlesztettünk ki. Az eredmények szerint folyadékkromatográfiás elválasztás növeli a könyvtár elemeinek tömegspektrométerrel történő megkülönböztethetőségét, kvalitatív és kvantitatív analízisét. Izobár peptidek meghatározásához nagyfelbontású MS készülékre van szükség.

Kvantitatív LC-MS vizsgálatokkal meghatároztuk egy potenciális gyógyszerjelölt, a neuropeptid FF antagonistá danzil-Pro-Gln-Arg-NH₂ farmakokinetikai paramétereit. Agyi mikrodialízis-kísérletekkel megállapítottuk, hogy a vegyület átjut a vér-agy gáton és sokáig kimutatható az agyban.

8. LC-MS és MS/MS vizsgálatokkal a világon először igazoltam, hogy a neurohipofízis nem csak a hipotalamikusan eredetű oxitocin és vazopresszin tároló szerve, hanem önmaga is képes termelni a két hormont (5. ábra).



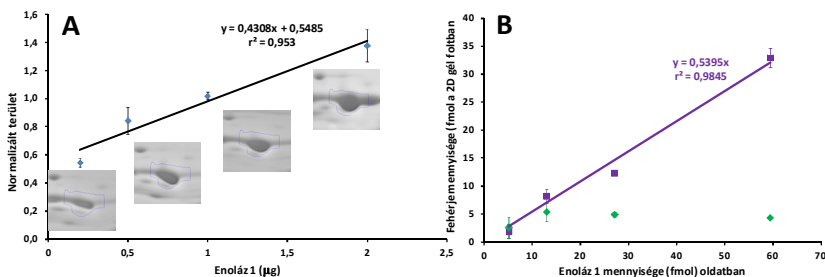
5. ábra

Neurohipofízis sejtkultúra felülúszójából készített MS/MS spektrumok

A: a vazopresszin [M+2H]²⁺ (m/z 542,8) ionjának MS/MS spektruma

B: az oxitocin [M+H]⁺ ionjának (m/z 1007,5) ionjának MS/MS spektruma

9. Proteomikai kísérleteink eredményei alapján a 2D-PAGE fehérjeanalízis jól reprodukálható módszer fehérjék expressziójának meghatározására. Megállapítottuk, hogy a 2D-PAGE alapján történő fehérjeprofil-változás kvantitatív meghatározásánál nem az egy kísérleti csoportban lévő állapotok biológiai varianciája, hanem a kivitelezés technikai varianciája a döntő paraméter. Szigorú statisztikai követelményeket támasztva kijelenthetjük, hogy kétszeres expresszióváltozás kimutatásához minimum 4 gélfuttatást kell végezni állatcsoportonként.
10. Új módszert dolgoztunk ki 1D- és 2D-gélben elválasztott fehérjék relatív és abszolút mennyiségének tömegspektrometriás meghatározására. Igazoltuk, hogy a „label-free”-MS technika lehetőséget teremt fehérjék specifikus mennyiségi analízisére nem csak oldatból, de gélből is. A 6/A. ábrán *E. coli* lizátummal együtt futtatott élesztő enoláz 2D elektroforetikus képének részlete látszik. Fluoreszcens festéssel nem lehet észrevenni az enoláz alatt meghúzódó *E. Coli* fehérjét (citrát-szintáz), de a tömegspektrometriás eljárásunkkal meg tudjuk határozni mennyiségi viszonyait (6/B ábra). Eljárásunkkal kiváló eszköz került a biológusok kezébe a fehérjeexpresszió pontosabb meghatározására.



6. ábra

Enoláz 1 kalibrációs görbéje *E. coli* lizátummal együtt futtatott fehérjekeverék 2D-PAGE elektroferogramjából fluoreszcens festéssel (A) és LC-MS^E-Top3 módszerrel meghatározva (B)

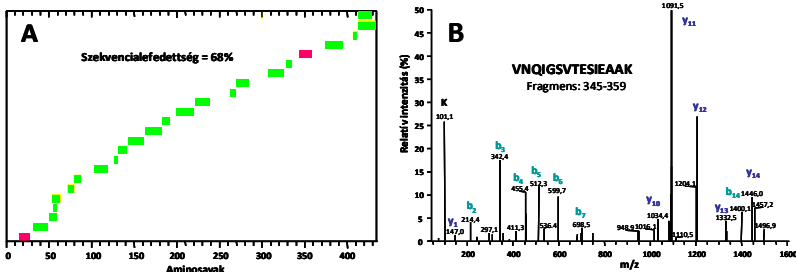
11. Búza és tritikálé magokat vizsgálva megállapítottuk, hogy természetes (pl. szárazság), ill. antropogén stresszorok (pl. gombaölő szer) hatására a növények PR-fehérjék megnövekedett termelésével válaszolnak. Ezen fehérjék jelentős része bizonyos betegekben gabona-allergiát vált ki, ill. cöliákiát okoz.

Feltérképeztük az emberi táplálkozásban Magyarországon használt gabona, ill. pszeudocereáliák fehérje-összetételét. Megállapítottuk, hogy minden gabonafajta tartalmaz több-kevesebb allergén fehérjét. Eddig nem volt ismert, hogy cöliákiás diétából nem kizárt amaránt és hajdina is tartalmaznak IgA-aktív allergén fehérjéket.

12. Proteomikai fehérjeazonosítással megállapítottuk, hogy a lucerna sejtekben kimutatható ciklin-függő kináz-inhibitor azonos az ubiquitinnel.

S. griseus-ból elsőként határoztuk meg egy sejt differenciálódást kiváltó autoregulátor fehérje, a C-faktor aminosavszekvenciáját.

Meghatároztuk, hogy programozott sejthalál tanulmányozására használt *C. elegans* fonalféregben a transzglutamináz enzim szubsztátjai az enoláz (7. ábra) és a mitokondriális ATP-szintáz alfa-1 alegység fehérjék.



7. ábra

Az enoláz fehérje azonosítása *C. elegans*-ból ESI-MS „peptid tömeg térképezéssel” (A) és a 1545,4 Da tömegű ion MS/MS spektruma (B)

A méhlepényből izolált, ill. rekombináns PP13, PP17, PP20, PP23, PP25 fehérjék, ill. kölcsönható partnereinek proteomikai analízisével és biokémiai vizsgálatával felderítettük azok funkcióit, ill. annak bizonyos részleteit.

A *S. cerevisiae* riboszómális Rli1 fehérjével kölcsönható fehérjék azonosításával és további kísérletekkel bebizonyítottuk, hogy a Rli1p, mint Fe/S fehérje alapvető szerepet játszik a riboszómák érésében és működésében.

Hideg-stresszre megnövekedő mennyiségű acetyl-coenzim A karboxiláz és a ATP-citrát liáz fehérjék azonosításával, majd szerepük vizsgálatával bizonyítottuk, hogy a hidegben a hőtermelésért felelős barna zsírszövetben emelkedett szintű zsírsavszintézis zajlik.

13. Tömegspektrometriás vizsgálatokkal felderítettem a hepatitis B vírus X-fehérjéjének szerkezetét, a diszulfidhidak elrendeződését.

Epitóptérképezéssel meghatároztam, hogy a HBxAg-vel szemben termelt monoklonális antitestek az antigén melyik epitópját kötik.

14. A betegségek háttérben rendszerint megváltozott biokémiai folyamatok zajlanak. Proteomikai módszerekkel feltérképeztük, hogy milyen fehérjék expressziója különbözik egy „szorongó” egér csoport és egy egészséges

- csoport között. A szakirodalomban először írtuk le, hogy a szorongás befolyásolja az agy aminosav-, nukleinsav- és szénhidrát-metabolizmusát, a sejten belüli redox rendszert és a szinaptikus dokkolás folyamatait.
15. Különböző tumoros sejteken hatékony substance-P analógok kölcsönható partnerei között α - és β -tubulin, β -aktin és Hsp90 fehérjéket találtunk. Megállapítottuk, hogy a Hsp90 funkciójának farmakológias gátlása jelentős szerephez juthat a daganatellenes terápiában.
 16. Bebizonyítottuk, hogy az AIDS gyógykezelésére használt nukleozid analógok miopátiát és kardiomiopátiát okozó mellékhatásaiért a szer által az aerob és anaerob energiatermelés és a jelátviteli mechanizmusokban okozott károsodások a felelősek.
 17. Az Alzheimer-kór patológiájában szerepet játszó amiloid-béta1-42 peptiddel végzett vizsgálatok során koprecipitálást követő tömegspektrometriás, valamint protein-chip kísérletekben meghatároztuk a peptiddel kölcsönható fehérjéket (1. Táblázat), valamint az általa okozott fehérjeexpresszió-változásokat.

1. táblázat

LC-MS/MS módszerrel azonosított, fibrilláris A β 1-42-vel koprecipitált legnagyobb mennyiségű fehérjék

Fehérje neve	Azonosító #	Peptidek száma
Szinapszin-1	P09951	73
Vakuólum ATP szintáz alegység B, agyi izoforma	P62815	46
Glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz, GAPDH	P04797	34
Bassoon protein	O88778	41
Szinapszin-2	Q63537	22
Tubulin β -lánc	P04691	25
Mielin bázikus protein S	P02688	32
Vakuólum proton transzlokáló ATPáz 116-kDa alegység a izoforma I	P25286	31
p130Cas-asszociált protein	Q9QXY2	12
Tubulin α -1 lánc	P02551	16

Kísérleteinkből arra következtettünk, hogy az az A β 1-42 elsősorban a riboszómális fehérjeszintézis, a mitokondriális energiatermelő folyamatok és a citoskeletális szerveződés gátlásán keresztül fejt ki neurotoxikus hatását.

18. Különböző agyterületek proteomikai vizsgálatával kimutattuk, hogy állatkísérletekben az ösztrogén hatékonyan véd az A β 1-42 neurotoxikus hatásával szemben és csökkenti a kolinerg sejtek pusztulását.

5. KIEMELKEDŐ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Protokollt dolgoztam ki szintetikus peptidek tisztaságellenőrzésére, melyben két ortogonális technikát, a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát és a micelláris elektrokinetikus kromatográfiát kombináltam a termékek tisztaságának biztonságosabb ellenőrzése és a peptidek fizikai-kémiai tulajdonságainak meghatározása érdekében.
2. Új, citotoxikus csoportot tartalmazó luteinizálóhormon-felszabadító hormon (LH-RH) származékot (55 db) állítottam elő, melyek különböző humán karcinóma sejtvonalakon tumorelles hatásának bizonyultak.
3. A nagy érzékenyséű tömegspektrometriás mérési feltételek kidolgozása után LC-MS vizsgálattal először bizonyítottam, hogy a hipofízis képes hormonjainak (oxitocin, vazopresszin) termelésére. Kidolgoztuk az IAMC-MS módszert és példákkal illusztráltam, hogy a tömegspektrometria hogyan alkalmazható a gyógyszerkutatóban.
4. Új proteomikai módszert dolgoztunk ki fehérjék poliakrilamid gélből történő kvantitatív meghatározására. Megállapítottuk, hogy a 2D elektroforetikus módszerrel végzett proteomikai fehérjevizsgálatok során a technikai variancia dominál a biológiai variancia felett.
5. Proteomikai módszerekkel fehérjéket azonosítottunk lucernából, talajlakó baktériumból, élesztőből, *C. elegans* fonalféregből, gabonafélékből, egérből, patkányból és humán szövetekből. A vizsgálatok eredményeképpen azonosított fehérjéknek új tulajdonságait, funkcióit és kölcsönhatásait derítettük fel, melyekből következtetni lehetett a vizsgált egyedekben végbemenő biológiai folyamatokra.
6. A szorongás állatmodelljének kidolgozásával és proteomikai analízisével kimutattuk, hogy a szorongás az agyban milyen biokémiai folyamatokat érint. Meghatároztuk, hogy az Alzheimer-kórban szerepet játszó amiloid 1-42 peptiddel milyen fehérjék alakítanak ki kölcsönhatást, ill. hogy az A β 1-

42 milyen folyamatokat indukál az agyban. Megállapítottuk, hogy az ösztradiol állatkísérletben kivédi az amiloid neurotoxikus hatását.

6. EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA

A peptidhormonok felfedezésével megnőtt az igény az olyan szintetikus peptidek, ill. analógjaik iránt, amelyek a humán betegségek diagnózisában, ill. terápiájában hasznosíthatók. A kolecisztokinin és analógja, a caerulein jól használható epehólyag motilitási (mozgékonyosági) zavarok diagnosztikájában. Alkalmas módszert dolgoztunk ki nagyobb mennyiségű caerulein-szulfátészter szintézisére és tisztítására. Az általunk előállított peptidet sok ezer epebántalmakban szenvedő beteg vizsgálatában használták fel.

A mellrák, de még inkább a prosztatacarcinóma hormonális kezelésére ma már az LH-RH analógjai a legfontosabb terápiás szerek. Prof. Schally laboratóriumában részt vettem a Magyarországon is forgalomban lévő LH-RH antagonistá Cetrorelix® kidolgozásában, de az általam előállított hatékonyabb peptidek csak „back-up” molekulák maradtak. A citotoxikus csoportokat azért építettünk be LH-RH és szomatosztatin analógokba, hogy a peptidek tumorelles hatását tovább fokozzuk, valamint hogy megnöveljük a citotoxikus szer célba jutásának valószínűségét.

Hasonlóképpen az LH-RH analógokhoz, a Substance-P analógjai is tumorelles hatású vegyületek. Szabadalmunkban bemutatott analógjai kissejtes tüdőkarcinóma sejtvonalakon hatásosak, így annak potenciális gyógyszerei.

A Hepatitis B vírus X-fehérjéjének előállítása, szerkezetének meghatározása, az ellene készült antitest epitópszervezetének felderítése egy diagnosztikai kit kifejlesztése érdekében történtek.

A szegedi Gabonatermesztési Kutató Kht. néhány transzgén búzáiról megállapítottuk, hogy szárazság hatására bennük különböző, nagy mennyiségű

allergén α -amiláz/tripszin inhibitor termelődik, ezért nem alkalmasak további termesztésre. Vizsgálataink nagy jelentőségűek az emberi fogyasztásra, ill. diétára nem ajánlott gabonafélék és pszeudocereálék kiszűrésére.

A pszichiátriai betegségek (mint pl. a szorongás) állatmodelljének kifejlesztésére és a proteomikai jellemzésére végzett kutatásaink is a gyógyszerfejlesztést szolgálták: a molekuláris szintű folyamatok, hálózatok megismerésével terápiás célpontok deríthetők fel.

A mára népbetegségnek számító Alzheimer-kór területén végzett proteomikai vizsgálatainkat a patológias folyamatok fehérjeszinten történő megismerése és a gyógyszerfejlesztéshez szükséges célfehérjék kijelölése érdekében terveztük és hajtottuk végre.

7. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Szókán Gy., **Janáky T.**
A kémia újabb eredményei 79. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia a peptidkémiaiában.
Akadémiai Kiadó, Budapest, pp 1-221, 1995.
2. Zarándi M., Tóth G.K., Váradi Gy., **Janáky T.**, Varga J.R. and Penke B.
Comparative solid phase synthesis of caerulein.
in: Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis II. Ed: Epton, R., Intercept, Andover, UK, pp. 503-506, 1992.
3. Tóth G.K., Pataricza J., **Janáky T.**, Mák M., Zarándi M., Papp J.G., Penke B.
Synthesis of 2 peptide scorpion toxins and their use to investigate the aortic tissue regulation.
Peptides 16, 1167-1172, 1995.
4. **Janáky T.**, Szabó E., Balásperi L., Adi B., Penke, B.
High-performance separation methods in the analysis of a new peptide-family: the galanins.
J. Chromatogr. B. 676, 7-12, 1996.
5. Balásperi L., **Janáky T.**, Mák M., Blazsó G., Józsa R., Takács T., Kása P.
Syntheses of Galanins, Their Fragments, and Analogs
Ann. N.Y. Acad. Sci. 863, 414-415, 1998.
6. Balásperi L., Adi B. **Janáky T.**, Blazsó G., Kása P., Mák M.:
Solid Phase Synthesis of Galanins, their Segments. and Analogs.
in: Peptides 1996. Proc. 24th European Peptide Symposium (Ed.: Ramage R., Epton R.) 1998, Mayflower Scientific, Birmingham, pp.235-236, 1996.
7. Balásperi L., **Janáky T.**, Blazsó G., Takács T., Dux M., Jancsó G., Kása P., László A.F., Józsa R., Mesch B., Mák M., Yanaihara N.:
Synthesis and biological characterization of Galanins and their novel analogs.
in: Peptides 1998. Proceedings of the 25th European Peptide Symposium. (Bajusz, S., Hudecz, F. Eds), Budapest, Hungary, 190-191, 1998.
8. Szókán Gy., **Janáky T.**, Krizsán K.:
Retenciós idő tervezése (Predikációs módszerek a peptid HPLC-ben)
Kém. Közl. 79, 121-138, 1994.
9. Tóth G.K., Laczkó I., Hegedűs Z., Vass E., Hollósi M., **Janáky T.**, Váradi G., Penke B. Monostori É.:
Synthesis of phosphotyrosine-containing T-cell receptor ζ -subunit peptides - conformational and immunological studies.
Peptides: Chemistry, Structure and Biology (Eds. Pravin T.P.Kaumaya and Robert S. Hodges), Mayflower Scientific Ltd, pp 460-461, 1995.
10. Tóth G., Laczkó I., Hegedűs Z., Vass E., Hollósi, M. **Janáky T.**, Váradi Gy., Penke B., Monostori É.:
Synthesis of phosphotyrosine-containing peptides: Immunological and conformational investigation.
in: Peptides in Immunology, ed. C.H. Schneider, John Wiley & Sons, pp. 223-230, (1996).
11. **Janáky T.**, Juhász A., Bajusz S., Csernus V., Srkalović G., Bokser L., Redding T., Nagy A., Schally, A.V.:
Analogues of luteinizing hormone-releasing hormone containing cytotoxic groups.
Proc. Natl. Acad. Sci. US. 89, 972-976, 1992.
12. **Janáky T.**, Juhász A., Bajusz S., Serfőző P., Bokser L., Rékási Z., Milovanović S., Redding T., Schally A.V.:
Short-chain analogs of LH-RH containing cytotoxic moieties.
Proc. Natl. Acad. Sci. US. 89, 10203-10207, 1992.

13. Szepesházy K., Schally A.V., Milovanovic S., Juhász A., Nagy A., **Janáky T.**
Effect of LH-RH analogs containing cytotoxic radicals on growth of estrogen independent
MXT mouse mammary carcinoma in vivo.
Anti-Cancer Drugs 3, 109-116, 1992.
14. **Janáky T.**, Juhász A., Bajusz S., Schally A.V.
Luteinizing hormone releasing hormone analogs with cytotoxic moiety.
Szabadalom: Lajstromszám: US6214969, Közzététel éve: 2001
15. Kele Z., **Janáky T.**, Mészáros T., Fehér A., Dudits, D., Szabó P.T.:
Capillary Chromatography/Microelectrospray Mass Spectrometry used for the Identification of
Putative Cyclin-dependent Kinase Inhibitory Protein in Medicago
Rapid Communications in Mass Spectrometry 12 1564-8, 1998.
16. Prókai L., Zharikova A., **Janáky T.**, Li X., Braddy A.C., Perjési P., Matveeva L., Powell,
D.H., Prókai-Tátrai K.:
Integration of mass spectrometry into early-phase discovery and development of central
nervous system agents.
J. Mass Spectrom. 36, 1211-1219, 2001.
17. Braddy A.C., **Janáky T.**, Prókai L.:
Immobilized artificial membrane chromatography coupled with atmospheric pressure
ionization mass spectrometry.
J. Chromatogr. A 966, 81-87, 2002.
18. Prókai L., Zharikova A., **Janáky T.**, Prókai-Tátrai K.:
Exploratory pharmacokinetics and brain distribution study of a neuropeptide FF antagonist by
liquid chromatography/atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry.
Rapid Comm. Mass Spectrom. 14, 2412-2418, 2000.
19. **Janáky T.**, Szabó P., Kele Z., Balásperi L., Varga Cs., Gálfi M., Vecsernyés M., Gáspár L.,
Juhász A., László F.A.:
Identification of oxytocin and vasopressin from neurohypophyseal cell culture.
Rapid Comm. Mass Spectrom. 12, 1765-8, 1998.
20. Gálfi M., **Janáky T.**, Tóth R., Prohászka Gy., Juhász A., Varga Cs., László F.A.:
Effects of dopamine and dopamine-active compounds on oxytocin and vasopressin production
in rat neurohypophyseal tissue cultures.
Reg. Pept. 98, 49-54, 2001.
21. Birkó Z., Sümegi, A., Vinnai, G., Wezel, F., Szeszák, F., Vitális, S., Szabó, P.T., Kele, Z.,
Janáky, T., Biró, S.:
Characterization of the gene factor C, an extracellular signal protein involved in morphological
differentiation of *Streptomyces griseus*.
Microbiology 145, 2245-2253, 1999.
22. Szabó P.T., Kele Z., Birkó Zs., Szeszák F., Biró S., **Janáky T.**
Identification of Factor C protein by electrospray mass spectrometry.
J. Mass Spectrom. 34, 1312-1316, 1999.
23. Marczinovits I., Molnár J., Kele Z., Szabó P.T., **Janáky T.**:
A simple folding method for high level production of the hydrophobic disulfide bonded B X-
protein by inclusion body route and its structural analysis.
in: Progress in Biotechnology 15, Stability and Stabilization of Biocatalysts, Eds: A.
Ballestros, F.J. Plou J.L., Iborra P.J., Halling, Elsevier, p. 269-274, 1998.
24. Pál J., Czömpöly T., Nyárády Z., Marczinovits I., **Janáky T.**, Kele Z., Felici F., Németh P.:
Determination of the fine epitope specificity of an anti-hepatitis B virus X protein monoclonal
antibody using microanalytical and molecular biological methods.
Mol. Immunol. 40, 241-6, 2003.

25. Kele Z., Ferenc G., Klement E., Tóth G., **Janáky, T.:**
Design and performance of a sheathless capillary electrophoresis/mass spectrometry interface by combining fused-silica capillaries with gold-coated nanoelectrospray tips.
Rapid Comm. Mass Spectrom. 19, 881- 885, 2005.
26. Ferenc G., Padar P., **Janaky T.**, Szabo Z., Toth G.K., Kovacs L., Kele Z.:
Capillary electrophoresis tandem mass spectrometry of bromine-containing charged derivatives of peptides.
J. Chromatogr. A. 1159, 119-24, 2007.
27. Földi I., Müller, G., Penke, B., **Janáky, T.**
Characterization of the variation of mouse brain proteome by two-dimensional electrophoresis.
J. Proteomics. 74, 894-901, 2011.
28. Szabó Z., Földi I., Szeliné Szomor J., **Janáky T.:**
LC-MS Based Label Free Quantification of Proteins Separated by 1D and 2D Gel electrophoresis.
In: HPLC 2011 Budapest Symposium: 36th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. Budapest, Magyarország, 2011.06.19-2011.06.23.
Budapest: 2011. p. L35. Paper 930. (ISBN: 978-963-89335-0-8)
29. Hajós Gy., Szabó E., **Janáky T.**
Two-dimensional electrophoresis, MALDI-TOF MS and blotting for identification and characterization of pathogenesis-related proteins in wheat cultivar.
Chromatographia 60, S 257-259, 2004.
30. Horváth-Szancs E., Szabó Z., **Janáky T.**, Pauk J., Hajós G.
Proteomics as an emergent tool for identification of stress-induced proteins in control and genetically modified wheat lines.
Chromatographia 63, S143-S147, 2006.
31. Takács K., Szamos J., Kovács E., **Janáky T.**, Polgár M., Gelencsér E.:
Immune-analytical detection of the cross-reactive major cereal allergens.
Food Agricult. Immunol. 21, 317-334, 2010.
32. Than N.G., Pick E., Bellyei S., Szigeti A., Burger O., Berente Z., **Janáky T.**, Boronkai A., Kliman H., Meiri H., Bohn H., Than G.N., Sümegi B.:
Functional analyses of placental protein 13/galectin-13.
Eur. J. Biochem. 271, 1065-78, 2004.
33. Than N.G., Sümegi B., Bellyei Sz., Berki T., Szekeres Gy., **Janáky T.**, Szigeti A., Bohn H., Than G.N.:
Lipid droplet and milk lipid globule membrane associated placental protein 17b (PP17b) is involved in apoptotic and differentiation processes of human epithelial cervical carcinoma cells.
Eur. J. Biochem. 270, 1176-1188, 2003.
34. Barna L., Bellyei Sz., Szigeti A., Boronkai Á., Szabó Z., Ohmacht R., **Janáky T.**, Than N.G., Szilágyi A., Závodszy P., Sümegi B.:
Humán placenta protein 20 (PP20) /tiamin-pirofoszfokináz (hTPK): szerkezettől a funkcióig.
Biokémia 27, 88-95, 2003.
35. Bellyei S., Szigeti A., Boronkai A., Szabó Z., Bene J., **Janáky T.**, Barna L., Sipos K., Minik O., Kravjak A., Ohmacht R., Melegh B., Závodszy P., Than G.N., Sümegi B., Bohn H., Than N.G.:
Cloning, sequencing, structural and molecular biological characterization of placental protein 20 (PP20)/human thiamin pyrophosphokinase (hTPK).
Placenta 26, 34-46, 2005.

36. Szigeti A., Bellyei S., Boronkai A., Minik O., Szabó Z., Bognár Z., Komlósi K., Ohmacht R., Melegh B., **Janáky T.**, Bohn H., Sümegi B., Than N.:
Sequence, structure and function of human placenta protein 23 (PP23)/SOUL protein.
FEBS Journal 272, 76, 2005.
37. Bellyei S., Szigeti A., Boronkai A., Pozsgai E., Gömöri E., Melegh B., **Janáky T.**, Bognár Z., Hocsak E., Sümegi B., Gallyas F. Jr.:
Inhibition of cell death by a novel 16.2 kD heat shock protein predominantly via Hsp90 mediated lipid rafts stabilization and Akt activation pathway.
Apoptosis 12, 97-112, 2007.
38. Kispál G., Sipos K., Lange H., Fekete Z., Bedekovics T., **Janáky T.**, Aguilar Netz D.J., Balk J., Rotte C., Lill R.:
Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria.
EMBO J. 24, 589-598, 2005.
39. Jakus P.B., Sándor A., **Janáky T.**, Farkas V.:
Cooperation between BAT and WAT of rats in thermogenesis in response to cold, and the mechanism of glycogen accumulation in BAT during reacclimation.
J. Lipid Res. 49, 332-339, 2008.
40. Mádi A., **Janáky T.**, Kele Z., Punyiczki M., Fésüs L.
Identification of glutamin donor protein substrates for transglutaminase .
Biochem. Biophys. Res. Com. 283, 964-968, 2001.
41. **Janáky T.**
Proteomika és szerepe a biomarkerkutatásban.
Gyógyszerészet 56, 406-413, 2010.
42. Szegő E.M., **Janáky T.**, Szabó Z., Csorba A., Kompagne H., Müller G., Lévy G., Simor A., Juhász G., Kékesi K.A.:
A mouse model of anxiety molecularly characterized by altered protein networks in the brain proteome.
Eur. Neuropsychopharmacol. 20, 96-111, 2010.
43. Virók D.P., Kis Z., Szegedi V., Juhász G., Zvara A., Müller G., Lévy G., Hársing L.G., Rajkó R., Penke B., Janka Z., **Janáky T.**, Puskás L.G.
Functional changes in transcriptomes of the prefrontal cortex and hippocampus in a mouse model of anxiety.
Pharmacological Reports 63, 348-361, 2011.
44. Orosz A., Szabó A., Szemán G., **Janáky T.**, Somlai C., Penke B., Bodor A., Perczel A.:
Novel nontoxic heat shock protein 90 inhibitors having selective antiproliferative effect.
Int. J. Biochem. Cell Biol. 38, 1352-1362, 2006.
45. Orosz A., Szabo A., Szeman G., Penke B., Somlai Cs., **Janáky, T.**
Pharmacologically active peptide derivatives, process for their preparation and pharmaceutical compositions containing the same.
Magyar Szabadalom HU 0500270 (A2), 2006-11-28.
46. Orosz A., Szabó A., Szemán G., Penke B., Somlai C., **Janáky T.**
Farmakológiai hatású peptidszármazékok, eljárás ezek előállítására és ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények.
Szabadalom: Lajstromszám: 0500270, Közzététel éve: 2006.
47. Skuta G., Fischer G.M., **Janáky T.**, Kele Z., Szabó P., Tözsér J., Sümegi, B.:
Molecular mechanism of the short-term cardiotoxicity caused by 2',3'-dideoxycytidine (ddC):
Modulation of reactive oxygen species levels and ADP-ribosylation reactions.
Biochem. Pharmacol. 58, 1915-25, 1999.

48. Verdier Y., Huszar E., Penke B., Penke Z., Woffendin G., Scigelova M., Fülöp L., Szűcs M., Medzihradsky K., **Janáky T.**:
Identification of synaptic plasma membrane proteins co-precipitated with fibrillar beta-amyloid peptide.
J Neurochem. 94, 617-628, 2005.
49. Verdier Y., Foldi I., Sergeant N., Fülöp L., Penke Z., **Janáky T.**, Szűcs M., Penke B.:
Characterization of the interaction between A beta 1-42 and glyceraldehyde phosphodehydrogenase
J. Pept. Sci. 14, 755-762, 2008.
50. Földi I., Bozsó Zs., Datki Zs., Szabó Z., Penke B., **Janáky T.**,
Proteomic study of the toxic effect of oligomeric A β 1-42 in situ prepared from “iso-A β 1-42”.
J. Neurochem. 117, 691-702, 2011.
51. Virók D.P., Simon D., Bozsó Z., Rajkó R., Datki Z., Bálint E., Szegedi V., **Janáky T.**, Penke B., Fülöp L.:
Protein Array Based Interactome Analysis of Amyloid- β Indicates an Inhibition of Protein Translation.
J. Proteome Res. 10, 1538-1547, 2011.
52. Szegő E.M., Csorba A., **Janáky T.**, Kékesi KA., Ábrahám IM., Mórotz GM., Penke B., Palkovits M., Kardos J., Juhász G.D.:
Effects of estrogen on β -amyloid-induced cholinergic cell death in the 1 nucleus basalis magnocellularis.
Neuroendocrinology 93, 90-105, 2011.
53. Szegő E.M., Kékesi K.A., Szabó Z., **Janáky T.**, Juhász G.D.:
Estrogen regulates cytoskeletal flexibility, cellular metabolism and synaptic proteins: A proteomic study.
Psychoneuroendocrinol. 35, 807-819, 2010.

Az értekezés alapját képező publikációk összesített impakt faktora:.....141,057

Publikációim összesített impakt faktora:.....237,162

Első és utolsó szerzős publikációim impakt faktora:.....53,224

A kandidátusi védés óta megjelent publikációim impakt faktora:.....181,994

A kandidátusi védés óta megjelent első és utolsó szerzős publikációim impakt faktora:46,302

Könyvek száma:3

Szabadalmak száma:8

Publikációimra és szabadalmaimra kapott független hivatkozások száma:.....825