

dc_272_11

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

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

JANÁKY TAMÁS

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
ORVOSI VEGYTANI INTÉZET
SZEGED**

2011

dc_272_11

Mottó: „Az analitika a kémia szolgálóleánya.”

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Rövidítések jegyzéke	4
1. Előszó	9
2. NAGYHATÉKONYSÁGÚ ELVÁLASZTÁSI MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA A PEPTIDKUTATÁSBAN	11
2.1. Bevezetés	11
2.1.1. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia	11
2.1.2. Kapilláris elektroforézis	12
2.1.3. Nagyhatékonyságú elválasztási módszerek a peptidkémiaiában	13
2.2. Célkitűzések	19
2.3. Biológiailag aktív peptidek előállítása, analízise és hatásainak vizsgálata	20
2.3.1. Caerulein	20
2.3.2. Peptid toxinok	22
2.3.3. Galaninok	25
2.3.4. Foszfopeptidek	31
2.3.5. Tumorellenes LH-RH-konjugátumok előállítása és vizsgálata	34
2.4. Diszkusszió	38
3. TÖMEGSPEKTROMETRIA ÉS LC/MS ALKALMAZÁSA A PEPTID- ÉS FEHÉRJEKUTATÁSBAN	39
3.1. Bevezetés	39
3.1.1. Tömegspektrometria	39
3.1.2. A tömegspektrometria alkalmazása peptidek, fehérjék analitikájában	40
3.1.3. Folyadékkromatográfia-tömegspektrometria (LC/MS).....	42
3.2. Célkitűzések	44
3.3. Előtanulmányok LC/MS kísérletekhez.....	45
3.3.1. Nagyérzékenységű LC-MS feltételeinek megteremtése.....	45
2.3.1.1. Kapilláris kromatográfiás oszlopok készítése	45
2.3.1.2. Nano- és kapilláris LC-MS ionforrás kialakítása	46
3.3.2. Atmoszférikus nyomású ionizációs módszerek összehasonlítása	48
3.3.3. IAMC-MS rendszer kidolgozása	50
3.4. Vizsgálatok LC/MS-sel	53

3.4.1.	A tömegspektrometria szerepe a gyógyszerkutatás folyamatának korai fázisában	53
3.4.2.	A neurohipofízis oxitocin és vazopresszin szintetizálóképességének igazolása..	59
3.4.3.	Ciklin-függő kináz – inhibitor azonosítása lucernasejtből	64
3.4.4.	<i>Streptomyces griseus</i> -ből származó C-faktor fehérje azonosítása	66
3.4.5.	Hepatitis B vírus X-fehérje szerkezetének felderítése	69
3.4.6.	Monoklonális anti-HBxAg antitestek epitóptérképezése	72
3.5.	CE-MS és CEC-MS interface kialakítása és alkalmazása	74
4.	PROTEOMIKA	79
4.1.	Bevezetés	79
4.2.	Célkitűzések	86
4.3.	Kísérlettervezési és módszerfejlesztési vizsgálatok	88
4.3.1.	A biológiai és technikai variancia vizsgálata	88
4.3.2.	Gélben elválasztott fehérjék mennyiségi meghatározása	93
4.4.	Gabona allergén fehérjéinek proteomikai analízise	98
4.4.1.	Szárazság-stressz hatása búzafehérjék összetételére	100
4.4.2.	Emelt dózisú gombaölő szer hatása tritikále magjának fehérje-összetételére	103
4.4.3.	Magyarországi gabonafajták és pszeudocereáliák allergén fehérjéinek vizsgálata	105
4.5.	Biokémiai kutatási problémák megoldásának elősegítése proteomikai fehérjeazonosítással	108
4.5.1.	Méhlepény-fehérjék (Placental Proteins, PP) proteomikai vizsgálata	108
4.5.2.	A mitokondrium esszenciális jellegének igazolása	115
4.5.3.	Barna zsírszövet fehérjéinek proteomikai analízise	118
4.5.4.	Transzglutamináz enzim szubsztrátjainak proteomikai meghatározása	119
4.6.	A proteomika gyógyszerkutatási alkalmazása.....	121
4.6.1.	A szorongás egy állatmodelljének kifejlesztése és proteomikai jellemzése ..	123
4.6.2.	Antitumor hatású peptidek célfehérjéinek azonosítása	127
4.6.3.	AIDS ellenes gyógyszer mellékhatásainak vizsgálata	130
4.7.	Amiloid 1-42 peptiddel (A β 1-42) kapcsolatos vizsgálatok.....	132
4.7.1.	A β 1-42-höz kötődő fehérjék meghatározása	132
4.7.2.	Oligomer A β 1-42 toxikus hatásainak proteomikai vizsgálata	135
4.7.3.	Oligomer A β 1-42-vel kölcsönható fehérjék azonosítása fehérjechip-en	138

4.7.4. Ösztradiol hatása az A β -indukálta kolinerg sejtpusztulásra	141
5. TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	145
6. KIEMELKEDŐ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	149
7. EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA	150
Köszönetnyilvánítás	152
A disszertációban felhasznált saját közlemények listája	153
Felhasznált irodalom	158
Függelék	166

Rövidítések jegyzéke

1D	egydimenziós
2D	kétdimenziós
A β	béta amiloid peptid
A ₂ bu	3,4-diamino-butanoil
A ₂ pr	2,3-diamino-propionil
ACC	acetyl-koenzim A karboxiláz
ACSF	mesterséges cerebrospinális folyadék
ADME	felszívódás, megoszlás, metabolizmus és kiválasztás
AG	agonista
Ahx	ϵ -amino-kapronsav
AIDS	szerzett immunhiányos tünet együttes
AMB	1-amino-3-metilbután
ANT	antagonista
APCI	atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció
AP-MALDI	légköri nyomású mátrix-segítette lézerdeszorpció ionizáció
APP	amiloid prekursor protein
ATP-CitLy	ATP-citrát liáz
AZT	3'-azido-3'-dezoxitimidin
AX	szorongó egértörzs
BAT	barna zsírszövet
BBB	vér-agy gát
BIND	„Biomolecular Interaction Network Database”
BioGRID	„Biological General Repository for Interaction Datasets” adatbázis
Boc	tercier-butiloxikarbonil védőcsoport
C18	oktadecil-szilika
C3H/HEN	egértörzs
C57BL6	egértörzs
cAMP	ciklikus adenosin-monofoszfát
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CD45	limfocita sejtfelszíni fehérje
CDK	ciklin-függő kináz
CE	kapilláris elektroforézis
CEC	kapilláris elektrokratográfia
CE-MS	kapilláris elektroforézis-tömegspektrometria
CEC-MS	kapilláris elektrokratográfia-tömegspektrometria
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)dimetilammonio]-1-propánszulfonát detergens
cDNS	mRNS-ről készült komplementer dezoxiribonukleinsav
CI	kémiai ionizáció
CID	ütközés-indukálta disszociáció
CKI	ciklin-függő kináz inhibitor
CPC	ciklopropán-karbonil
CZE	kapilláris zónaelektroforézis
csGAL	csirke galanin
CV%	variációs koefficiens %
DBPS	Dubbelco foszfát puffer
DCC	diciklohexil-karbodiimid
DDBJ	DNA Database of Japan
ddC	didezoxicitidin

dc_272_11

DIEA	di-izopropil-etilamin
DIGE	differentiális gélelektroforézis
DMV	dohánymozaik vírus
DNS	dezoxiribonukleinsav
DOXG	glutaril-doxorubicin
DTT	ditiotreitol
E2	ösztadiol
ED ₅₀	effektív dózis (az a dózis, amely a maximális hatás 50%-t hozza létre)
ELISA	enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat
EI	elektron ionizáció
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EOF	elektroendozmotikus áramlás
ESI	elektrospray ionizáció
ETD	elektron-átmenetes disszociáció
FAB	gyors atom bombázásos ionizáció
FDR	„false discovery rate”, hibás találati arány
FPLC	gyors fehérjekromatográfia
Fmoc	9-fluorenilmetiloxikarbonil védőcsoport
FSH	follikulus-stimuláló hormon
FT-ICR	Fourier-transzformációs ion-ciklotron rezonancia
GAL	galanin
GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GNRNA	redukciós és alkilezési lépést nem alkalmazó, gélben történő enzimes proteolitikus módszer
GnRH	gonadotropin felszabadító hormon
GO	gén ontológia
GRA	redukciót és alkilezést alkalmazó gélben történő enzimes proteolitikus módszer
GST	glutation S-transzferáz
HBV	Hepatitis B vírus
HBxAg	Hepatitis B vírus x antigénje
HeLa	humán sejtvonal
hCG	humán koriogonadotropin hormon
hGAL	humán galanin
HMAQG	glutaril(2-hidroximetil-antrakinon)
HMW	nagy molekulatömegű
HOBt	hidroxibenzotriazol
hPL	humán placentáris laktogén
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
Hsp	hő sokk fehérje
hTPK	humán tiamin-pirofoszfokináz
HTS	nagy áteresztőképességű szűrés
IA	indolilecetsav
IAM	rögzített mesterséges membrán
IAMC	rögzített mesterséges membrán kromatográfia
IEF	izoelektromos fókuszálás
IgA	immunglobulin A
IgE	immunglobulin E
IPG	immobilizált pH gradiens csík
k'_{IAM}	kapacitási faktor a rögzített mesterséges membrán kromatográfiában

dc_272_11

KEGG	„Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes” adatbázis
LC-MS	foliadékkromatográfia-tömegspektrometria
LH	luteinizálóhormon
LH-RH	luteinizálóhormon-felszabadító hormon
LNCaP	prosztatakarcinóma sejtvonal
m/ Δ m	felfontás a tömegspektrometriában
m/z	tömeg/töltés
MASCOT	adatbáziskereső szoftver
MCF-7	emlőkarcinóma sejtvonal
MALDI	mátrix-segítette lézerdeszorpciós ionizáció
MBHA	4-metilbenzidrilamin gyanta
MCI-H69, 82	kissejtes tüdőkarcinóma sejtvonalak
MDa-MB-231	emlőkarcinóma sejtvonal
MEKC	micelláris elektrokinetikus kromatográfia
Mel	melfalán, (4-[bisz(kloroetil)amino]fenilalanin
Met-O	metionin szulfoxid
MINT	„Molecular INTERaction” adatbázis
MLGM	lipid csepp membrán
MPLC	közepes nyomású foliadékkromatográfia
mRNS	hírvivő ribonukleinsav
MS	tömegspektrometria
MS ^E	speciális tömegspektrometriás adatgyűjtési mód
MS/MS	tandem tömegspektrometria
Mt	molekulatömeg
mtDNS	mitokondriális DNS
MudPIT	multidimenzionális fehérjeazonosítási technológia
MTX	metotrexát
NADH	nikotinsavamid-adenin-dinukleotid
NAX	nem szorongó egértörzs
NBM-SI	nucleus basalis magnocellularis-substantia innominata agyterület
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ncRNS	nem kódoló RNS
NK	nincs kötés
NMR	magmágneses rezonanciaspektroszkópia
NMRI	egértörzs
NPFF	neuropeptid FF
nrNCBI	nem redundáns NCBI adatbázis
ns-LTP	nem specifikus lipid transzfer protein
ORF	nyitott leolvasási keret
Orn	ornitin
PAG	poliakrilamid gél
PAGE	poliakrilamid-gélelektroforézis
Pal	piridilalanin
PAM	fenil-acetamido-metil gyanta
PC-3	prosztatakarcinóma sejtvonal
PFF	peptid fragmens térképezés
pGAL	patkány galanin
pI	izoelektromos pont
PIR	„Protein Information Resource”
PMF	peptid tömeg térképezés

dc_272_11

PP	placenta fehérje
PR	patogénekkal szemben képződő fehérjék
PSD	metastabil fragmentáció
Q-TOF	kvadrupól- repülési idő hibrid tömegspektrométer
RIA	radioimmunoassay
Rli1p	riboszóma fehérje
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigén gyökök
RP	fordítottfázisú
RuBPs	ruténium-batofenantrolin-szulfonát
SCLC	kissejtes tüdőtumor
SDS	nátriumdodecilszulfát
SEM	az átlag standard hibája
sGAL	sértés galanin
SH-SY5Y	neuroblasztóma sejtvonal
SKBr-3	emlőkarcinóma sejtvonal
SSCTX	szomatoszenzoros kéreg agyterület
STRING	„Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins” adatbázis
SzTE	Szegedi Tudományegyetem
T-47D	emlőkarcinóma sejtvonal
TAP-tag	Tandem Affinity Purification
TCBL	Substance P analógok
TCR/CD3	T-sejt receptor/CD3 komplex
TEAP	triethylammónium-foszfát
TFA	trifluorecetsav
t _M	vándorlási idő
TMBHA	4-(benziloxi)-2,4-dimetoxibenzhidrilamin gyanta
TOF	repülési idő analizátor
TPK	tiamin-pirofoszfokináz
t _R	retenció idő
tRNS	transzfer ribonukleinsav
TrEMBL	lefordított EMBL adatbázis
UCSF	University of California San Francisco
UPLC	ultranagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
UV	ultraibolya
WASI	búza alfa-amiláz/szubtilizin inhibitor
WAT	fehér zsírszövet
WCI	kimotripszin inhibitor
ZAP 70	Zeta-lánc-asszociált protein kináz 70
ZDV	nulla holtterfogat

Kódolt aminosavak és rövidítésük

Aminosav neve	Egybetűs kód	Hárombetűs kód
Alanin	A	Ala
Cisztein	C	Cys
Aszparaginsav	D	Asp
Glutaminsav	E	Glu
Fenilalanin	F	Phe
Glicin	G	Gly
Hisztidin	H	His
Izoleucin	I	Ile
Lizin	K	Lys
Leucin	L	Leu
Metionin	M	Met
Aszparagin	N	Asn
Prolin	P	Pro
Glutamin	Q	Gln
Arginin	R	Arg
Szerin	S	Ser
Treonin	T	Thr
Valin	V	Val
Triptofán	W	Trp
Tirozin	Y	Tyr

1. ELŐSZÓ

Szerencsés embernek érzem magam, mert mindkét eddigi munkahelyemen, illetve külföldi tanulmányútjaimon olyan közegbe kerültem, olyan munkatársakkal dolgozhattam, ahol, ill. akik mindig fogékonyak voltak a tudomány és technika újdonságaira és lehetőségünk is volt ezeknek laboratóriumainkban történő bevezetésére. Amint az a disszertáció elején látható mottóból sejthető, elsősorban analitikusnak tartom magam. Úgy gondolom, hogy az analitikai kémia egyik legfőbb feladata, hogy a társtudományok számára újabb és újabb, érzékenyebb, specifikusabb, gyorsabb, egyszerűbb és olcsóbb analitikai eljárásokat, módszereket fejlesszen ki és elősegítse azok fejlődését. Ezért vallom Prof. Theodor Wieland mondását is, hogy „Az analitika a kémia lelke.”

Mindeddig az orvostudomány közelében dolgoztam (Szegedi Orvostudományi Egyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem, Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kara, V.A. Medical Hospital, New Orleans, University of Florida, Gyógyszerésztudományi Kar, Gainesville), így érthető, hogy a disszertációban bemutatott eredmények néhány kivétellel 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.

Köszönhetően az 1994-ben beszerzett tömegspektrométernek, itthon az én munkacsoportom használta először a tömegspektrometriát természetes és szintetikus peptidek 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, sejttenyészeteken 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 munkacsoportomhoz.

A disszertáció három fő fejezetének elején bemutatom a tárgyalt analitikai módszer történetét, alapelveit és alkalmazhatósági területei. Ezután minden egyes témáról rövid elméleti áttekintést adok, amelyet a kísérletek vázlatos leírása, az eredmények bemutatása és megbeszélésük követ. Ahhoz, hogy az elért új tudományos eredmények ne külön-külön fejezetekben jelenjenek meg, azokat a disszertáció végén foglaltam össze. Ide került az eredmények gyakorlati jelentőségéről szóló ismertetés is.

Szeged, 2011, október 15.

2. NAGYHATÉKONYSÁGÚ ELVÁLASZTÁSI MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA A PEPTIDKUTATÁSBAN

2.1. BEVEZETÉS

2.1.1. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

A kromatográfiát múlt század elején Tswett [1] használata először, utána sokáig nem volt a tudományos érdeklődés előterében, de a 40-es években bevezetett megoszlási- [2], papír- [3] és ioncserés kromatográfia [4] az 50-es években kifejlesztett gázkromatográfia [5] és vékonyrétegekromatográfia [6], majd a 60-as években megjelenő gél- vagy méretkizárásos kromatográfia [7] nagyszerű eredményeinek hatására egyre szélesebb körben talált alkalmazásra. Hamarosan ezután, különösen az élettudományokkal foglalkozók részéről felmerült és egyre növekvő igény vezetett a nem-illékony, vízzoldható minták jobb és gyorsabb elválasztását megvalósító nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia („High-Performance Liquid Chromatography”, HPLC) kifejlesztéséhez [8]. A HPLC – amely kiválóan felhasználható a gyakran bonyolult összetételű keverékek komponenseinek elválasztására, azonosítására, mennyiségi meghatározására és tiszta állapotban történő kinyerésére – messzemenően teljesítette az iránta felmerült kívánságokat és 45 éves története alatt a leghatékonyabb kromatográfiás technikává nőtte ki magát. Használatával gyakran olyan feladatok is megoldhatóvá váltak, melyek nélküle egyáltalán nem vagy csak nehezen lettek volna kivitelezhetők. A HPLC atyjának tekintett Horváth Csaba szavaival élve „HPLC is a method of unsurpassed versatility and a microanalytical tool par excellence” [9]. A HPLC készülék az analitikai laboratóriumok standard felszerelése, a mérleg és a pH-mérő után a harmadik leggyakoribb műszer. Használata áttörést hozott a biokémikusok és biológusok munkájában, mert képes a biológiai minták egyes komponenseinek tiszta állapotban történő izolálására és azok minőségi és mennyiségi analízisére. A mintegy 30-35 évvel ezelőtt kezdődő alkalmazása a peptidek és fehérjék analitikájában hozzájárult a biológiai tudományok robbanásszerű fejlődéséhez, lehetővé téve ezen anyagok gyors és érzékeny analízisét [10]. Bár Vámos Endre [11] gondolatait eredetileg még a kromatográfiára vonatkozóan fogalmazta meg, de teljesen igaznak bizonyultak a HPLC-re is: „új elválasztási és vizsgálati módszerek felismerése gyakran váltja ki egy vagy több tudományág rohamos fejlődését. Fokozott mértékben érvényes ez a kromatográfiára, amely a természetes anyagok szerves kémiájának egészen új és járatlan útjait nyitotta meg.”

A HPLC legjellemzőbb tulajdonsága és legfőbb erénye a kiváló felbontóképesség, ami által a szerkezetileg nagyon hasonló (rokon), ill. meglehetősen különböző vegyületek

egymástól jobban elválaszthatók, megkülönböztethetők [12]. Ez a képessége onnan ered, hogy a minta, az állófázis és a mozgófázis közötti kölcsönhatások eredőjeként létrejövő retenciója, ill. csúcsszélesség a különböző típusú kromatográfiás módszerek körülményeinek „finomhangolásával” könnyen változtathatóak és így a célvegyület a többitől elválasztható. A kereskedelmi forgalomban elérhető különböző szelektivitású állófázisok óriási száma és a szelektivitás könnyű befolyásolása a mozgófázis tulajdonságainak egyszerű változtatásával hatalmas lehetőségeket rejt. A 70-es évek elején jelentek meg a jó nyomásállóságú szilikagél felszínén kémiaiilag kötött, többnyire hidrofób alkil- és aril-csoportokkal (C8, C18, fenil) borított, ún. „fordítottfázisú” („reversed phase”, RP) töltetek [13]. Szelektivitásuk és hatékonyságuk függ a szilikagél fizikai és kémiai tulajdonságaitól, a kötött fázis típusától és kialakításának módjától. A módosított felületű állófázisok bevezetése kibővítette a HPLC alkalmazhatóságát megnyitva az utat a poláris, vízzoldható anyagok analízise felé (bioanalitika) és ezáltal rendkívüli módon felgyorsította a módszer elterjedését. Az RP-HPLC ma a kromatográfia „igáslova”, a kromatográfiás elválasztások 90% ilyen tölteteken történik.

Rendkívül széleskörű felhasználási területei közül a gyógyszer-, élelmiszer- és vegyipari, környezetanalitikai, biotechnológiai, toxikológiai, klinikai kémiai és élettudományi (bioanalitika) alkalmazásait emelem ki, de kiemelkedő szerepe van kutatólaboratóriumok elválasztástechnikai feladatainak megoldásában is.

2.1.2. Kapilláris elektroforézis

Az elektroforézisen alapuló elválasztástechnikai eljárások a töltéssel rendelkező részecskék (ionok) elektromos erőterben történő differenciálvándoroltatásán alapulnak: a különböző töltésű és méretű ionok eltérő sebességgel és különböző irányba mozognak, amely alkalmas körülmények között felhasználható a részecskék elválasztására.

Az elektroforézis elméleti alapjainak XIX. század végi tanulmányozása után az 1930-as évekig kellett várni, amíg az elektroforézis valódi elválasztástechnikai módszerré nőtte ki magát. Fehérjékkel végzett kísérletei során Arne Tiselius oldatfázisú (hordozó nélküli) elektroforézissel szérumfehérjéket választott el egymástól [14]. A fehérjeelektroforézis területén végzett munkáját 1948-ban Nobel-díjjal jutalmazták. Az ötvenes években vezették be a papírelektroforézist aminosavak vizsgálatára [15], majd a cellulózacetát, cellulóznitrát membránokon végzett elektroforézist szérumfehérjék klinikai meghatározására. Martin és munkatársai [16] kísérletei vezettek az agaróz lapgélelektroforézis kifejlesztéséhez (DNS elválasztások), majd Smithier keményítőgél alkalmazott fehérjék elválasztására [17]. A kétdimenziós elektroforézis alapjait is ő rakta le, első dimenzióban papír-, majd keményítőgél

alkalmazva [18]. A nátriumdodecilszulfátot alkalmazó poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) bevezetése [19] óriási lökést adott a fehérjekutatásnak, mert segítségével a fehérjék molekulatömeg szerint elválaszthatók. Az izoelektromos fókuszálás kombinálása az SDS-PAGE-val O'Farrel nevéhez köthető [20]. Ez az eljárás az immobilizált pH gradiens csík [21] alkalmazásával mind a mai napig a legnagyobb felbontóképességű elválasztási módszer fehérjék analíziséhez. Ez az oka annak, hogy a 2D-elektroforézis rendszer ma is az egyik alapkészüléke a proteomikai laboratóriumoknak.

Jorgenson és Lukács [22] 1981-ben bejelentették az első kapilláris zónaelektroforetikus elválasztást: 75 µm belső átmérőjű ömlesztett kvarc kapillárisban 30 kV feszültséget alkalmazva on-line detektálással fehérjéket különítettek el addig nem látott nagy felbontással, érzékenységgel és sebességgel. A következő jelentős lépés a micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC) Terabe által történt kidolgozása volt [23], amely lehetővé tette a minta ionos (v. ionizálható) komponenseivel egyidejűleg az apoláris, hidrofób vegyületek elektroforetikus analízisét is. A kapilláris elektroforézis terjedésével és fejlődésével az addig ismert elektroforetikus módszereknek kidolgozták a nagyhatékonyságú változatait is, így megjelentek a kapilláris izotachoforézis, izoelektromos fókuszálás és gélelektroforézis, valamint lendületet vett a kapilláris királis elválasztások kidolgozása is. A 90-es évek második felében új elválasztási módszer jelent meg: a kapilláris elektro-kromatográfia. Pretorius már 1974-ben megjósolta [24], hogy ha a kapilláris kromatográfiás oszlopon hidrodinamikai áramlás helyett a kapillárisban elektromos áram hatására kialakuló elektroosmotikus áramlást (EOF) használják a mozgó fázis meghajtására, sokkal nagyobb felbontásokat lehet elérni. Elsősorban a gyógyszeriparban kezdték el alkalmazni [25], azonban a felmerült problémák miatt jövője kétséges [26].

A kapilláris elektroforézisben rejlő rendkívül nagy hatékonyságú elválasztások lehetősége, a módszer gyorsasága és flexibilitása, az elhanyagolható mennyiségű oldószer használata, az automatizált készülékek piacra kerülése a kapilláris elektroforézis elterjedéséhez vezetett, amikor a HPLC-vel szembeni (melletti) alternatív módszerre volt szükség. A kapilláris elektroforézis legnagyobb sikere a sokcsatornás CE készülékek alkalmazásával végrehajtott Human Genom Program határidő előtti befejezése [27].

2.1.3. Nagyhatékonyságú elválasztási módszerek a peptidkémiaiában

Peptidek szintézise egyre növekvő kihívást jelentett (és jelent), ahogy az előállítandó peptidlánc összetettsége és hossza növekedett. A múlt század közepén a peptidkémia úttörői

számtalan és gyakran leküzdhetetlen nehézséggel kerültek szembe annak ellenére, hogy minden rendelkezésükre álló eszközt igyekeztek felhasználni [10]. A klasszikus, lépésenkénti oldatfázisú szintézissel elért sikereikhez, melyeket különböző szintézis-stratégiák és új védőcsoportok alkalmazásával értek el, sok-sok probléma megoldásán keresztül jutottak el. Ez magyarázhatta azt, hogy miért volt többségük számára olyan nehéz feladni a szintézis intermediereinek (a tiszta végtermék biztosítása érdekében végzett) körültekintő izolálását és megérteni a szilárd fázisú peptidszintézis eleganciáját, és támogatólag alkalmazni azt. Ez bizonyos szempontból érthető volt, mert a szilárd-fázisú peptidszintézis során nem tisztítják az egyes közbenső lépések termékeit, melynek következtében a végtermék rendszerint nem kimondottan homogén, s nem állt rendelkezésre olyan módszer, amivel kvantitatívan meg lehetett volna határozni a peptidek tisztaságát.

Az oldatfázisú szintézis védett intermedierek peptidjeinek tisztítását a klasszikus szerves kémia módszereivel (extrakció, kristályosítás stb), valamint oszlopkromatográfiával végezték. Sephadex® LH-20, LH-60 vagy G-50 oszlopokon dimetilformamid vagy hexametilfoszforsavtriamid eluenseket, szilikagél tölteteken kloroformot és különböző alkoholokat használtak eluensként. Ezek a módszerek, ill. az ellenáramú megoszlással végzett tisztítások meglehetősen lassúak voltak (2-4 nap), s bár a polisztirol gyantán tetrahidrofuránnal gyorsabban lehetett kromatografálni, az csak a molekulatömegben jelentősen különböző anyagokat választotta el.

A természetes forrásból származó biológiailag aktív peptidek (tirotropin felszabadító hormon, gonadotropin felszabadító hormon, szomatosztatin stb.) izolálására, ill. szilárd-fázisú szintézissel előállított analógjaik tisztítására preparatív vékonyrétegekromatográfiát, ioncserés kromatográfiát, gélkromatográfiát és Sephadex LH-20-on végzett megoszlási kromatográfiát használtak több-kevesebb sikerrel [28].

A természetben újonnan felfedezett és izolált rendkívül nagy hatékonyságú (már nanopiko-, 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. Azt is mondhatjuk, hogy a HPLC bevezetése nyitotta meg az utat a szilárdfázisú peptidszintézis elterjedésének, s az évek során a két módszer annyira összenőtt, hogy ma már nincs korszerű peptidkémiai laboratórium nélkülük.

A fordítottfázisú HPLC első dokumentált használata peptidek tisztaságának megállapítására 1973-ból Rzeszotarskitól és Mauger-től származik [29], akik aktinomicint választottak szét három komponensre (183 cm x 2,3 mm Bondapack C18 töltetű oszlop). Tsui bacitracinnal végzett kísérletei [30, 31] irányították igazán a figyelmet HPLC peptidkémiai alkalmazhatóságára. Tsui egy addig csak 7 komponensűnek ismert kereskedelmi bacitracint Bondapack C18/Corasil töltetű oszlopon (100 cm x 2,1 mm) foszfát puffer (pH 4,5)-metanol-acetonitril eleggyel analizált és 22 komponenst mutatott ki.

A HPLC rohamos peptidkémiai elfogadására és térhódítására utal az a tény is, hogy az 1974-es izraeli Európai Peptidszimpóziumon már kerekasztal-megbeszélést tartottak a világ vezető peptidkémikusai ezen új elválasztástechnikai módszerről.

Bár néhány laboratóriumban a védett vagy módosított peptidek elválasztására normál-fázisú HPLC-t kezdtek el alkalmazni [32, 33], az igazi áttörést a fordított fázisú HPLC alkalmazási lehetőségeinek felderítése [34] és új típusainak kialakulása [35, 36] hozták. Bennet és mtsai [37] eluensrendszerének kidolgozása óriási lökést adott a fordított-fázisú HPLC peptidkémiai elterjedésének, mind analitikai, mind preparatív alkalmazásának, mert C18 oszlopon 0,1% trifluorecetsavat tartalmazó víz-acetonitril eluenssel az elválasztási problémák 90%-a megoldható volt. Ma is ezt a rendszert használjuk leggyakrabban.

Az eredményekkel jöttek a problémák is, viszont ezek újabb fejlesztéseket indítottak el mind az állófázis (kisebb szemcseméretű, különböző pórusátmérőjű, új típusú kötött fázisú, nagyobb széntartalmú stb.), mind a mozgófázis adalékanyagainak szempontjából (hangyasav, ecetsav, heptafluor-vajsav, ammónium foszfát, trietilammónium-foszfát, trietilammónium-formiát, ionpároképzők stb.) tekintetében [38, 39]. Ez oda vezetett, hogy a fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia az évek során a peptidkémiai laboratóriumokban standard és nélkülözhetetlen módszerré és csaknem egyeduralkodóvá vált [40]. A nagyszámú gyártótól származó, különböző szemcseméretű, pórusátmérőjű, szelektivitású, fajlagos felületű és eltérő apoláris láncú töltetek, oszlopok alkalmazásával a legtöbb preparatív és analitikai feladat megoldható. A vízoldható biopolimerek tömegspektrometriás analízisét és a kromatográfia tömegspektrométerhez való on-line kapcsolását lehetővé tévő atmoszférikus

nyomású ionforrások (ESI és APCI) kifejlesztése kibővítette a HPLC alkalmazhatóságát, a peptidkémiai alkalmazásán túl gyakorlatilag egy új tudományágnak, a proteomikának a kifejlődéséhez vezetett.

Fordított fázisú kromatográfiában a szilikagélen *n*-alkilcsoportot tartalmazó tölteten a biomolekulák retencióját a hidrofób és szilanofil kölcsönhatások kombinációja vezérli. Egy kromatográfiás rendszer szelektivitását döntő mértékben az állófázis tulajdonságai határozzák meg, így elsősorban ezek felelősek a különböző rendszerek közötti szelektivitásbeli eltérésekért. Ahogy azt a „**Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia a peptidkémiaiában**” című könyvünkben tárgyaltuk [I]¹, a peptidok és fehérjék ionos vegyületek. Emiatt a pH befolyásolja funkciós csoportjaik disszociációját, ezen keresztül töltésüket, ami így hatással lesz az egyes komponensek retenciójára. A mozgó fázis kémhatása ezért jelentősen befolyásolja a szelektivitást. A mozgó fázis szerves komponensének változtatása rendszerint nem okoz jelentős szelektivitásbeli különbségeket, de növelheti a pH és az állófázis változtatása által okozott különbségeket. Az RP elválasztások szelektivitását a hőmérséklet is befolyásolhatja.

Más elválasztási elven alapuló nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás eljárások (pl. az ioncserés, hidrofób kölcsönhatási és gél-szűrési HPLC) egyre nagyobb teret nyernek a szennyezésprofil meghatározásában, azonban alkalmazásuk specifikus és limitált.

A teljesség igénye nélkül felsorolom a peptidkutatás azon területeit, amelyeknél a HPLC sikeresen alkalmazható [I]:

- kiindulási anyagok, intermedierek tisztaságvizsgálata,
- peptidkapcsolás nyomon követése (kvantitatív módon is),
- reakciók optimálása, kapcsolási intermedierek felderítése,
- új reagensek, kapcsolások minősítése,
- védőcsoport eltávolítások, peptidészter hidrolízisek ellenőrzése,
- mellékreakciók (transzpeptidáció, oxidáció, deszulfatálás, alkileződés, dezamidálódás, racemizáció, epimerizáció, ciklizáció stb.) kimutatása,
- optikai tisztaságvizsgálat,
- szilárdfázisú szintézissel készült termékek hibás peptidjeinek kimutatása,
- preparatív tisztítások kromatográfiás feltételeinek optimálása és ellenőrzése,
- szemipreparatív és preparatív tisztítások,
- szintetizált peptid végtermékek tisztaságvizsgálata,

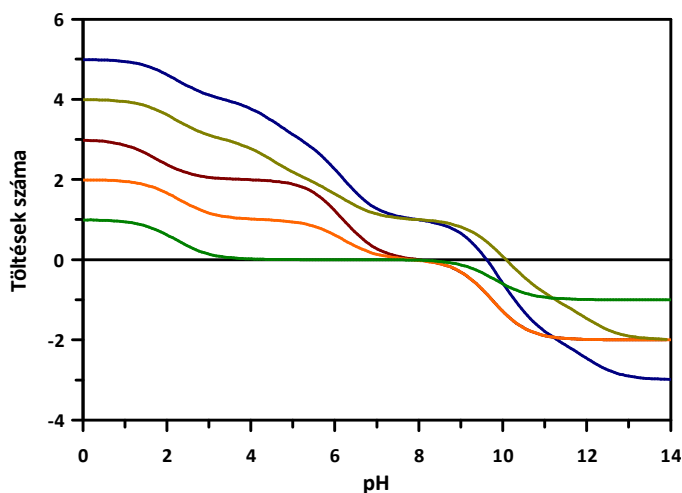
¹ A disszertációban felhasznált saját közleményekre hivatkozást [római számokkal] jelzem.

- racemizációs tesztek,
- aminosav-analízis, jellemzés,
- szerkezetanalízis, szekvenálás,
- peptidmetabolizmus vizsgálatok,
- szerkezet-hatás összefüggések felderítése, modellezése,
- membránkölcsönhatások modellezése,
- peptidtérképek készítése,
- proteomikai vizsgálatok,
- poszttranszlációs módosítások kimutatása,

A szilárd fázisú peptidszintézis során az előállítandó peptid méretétől és szekvenciájától függően különböző mennyiségű melléktermék képződik. A kapcsolási reakciók számának növekedésével (nagyobb peptid, „rossz” szekvencia miatti ismételt kapcsolás) rendszerint nő az esélye a mellékreakcióknak, a nem kívánt termékek megjelenésének, melyek csökkentik a nyers termék tisztaságát. A termék szennyezései egyrészt a kapcsolási reakciók és a védőcsoportok eltávolítására használt reagensektől, másrészt peptid jellegű melléktermékektől (pl. védőcsoportot tartalmazó, hiányos szekvenciájú, rövidebb vagy aggregált peptidek) származnak. Az első típusú szennyezőktől aránylag könnyű megszabadulni, mert többnyire ismert a minőségük, azonban a második csoportba tartozó szennyezések gyakran a termékhez hasonló polaritásúak, nagyságúak és hidrofóbicitásúak, ezért kromatográfias tulajdonságaik is nagyon hasonlóak. Ezért peptidek tisztaságának, ill. a szennyezésprofilnak a felderítéséhez eltérő szelektivitású és nagy hatékonyságú elválasztástechnikai módszerekre volt/van szükség. Ahhoz, hogy minden szennyezőt felderítsünk, sosem elegendő egy módszer vagy technológia: több egymással ortogonális (különböző elven működő) elválasztástechnikai eljárásra van szükség. Kiegészítő jellegű módszerek egymás melletti alkalmazása esetén nagy az esélye annak, hogy minden, a detektálási szint feletti mennyiségű szennyezést meg lehessen különböztetni a terméktől. Peptidek elválasztására, szennyezőinek felderítésére a kapilláris elektroforézis kiváló alternatívának bizonyult a különböző típusú HPLC-s elválasztások mellett. Ez annak köszönhető, hogy a kapilláris elektroforézis gyors, egyszerű, könnyen automatizálható, mennyiségi elemzésre is használható, de mindenekelőtt nagyhatékonyságú módszer vízzel oldható kis mennyiségű peptidek, fehérjék kis térfogatban történő elválasztására.

A kapilláris zónaelektroforézisben az elválasztás a töltéssel rendelkező peptidek elektromos erőterben történő eltérő vándorlási sebességével magyarázható, melyet a peptidek

különböző töltés/méret aránya okoz. A peptidek töltését az oldószer pH-ja erősen befolyásolja, mert ionizálható csoportjainak protonáltsága a puffer H^+ -ion koncentrációjától függ. A töltések száma a Henderson-Hasselbalch egyenlet alapján számítható ki. Néhány galanin peptid (lásd 2.3.3. fejezet) ionizáltsági állapotának pH függését mutatja az 1. ábra. A pH kis változása a nettó töltésszám jelentős változását okozhatja, különösen az amino- és karboxilcsoportok pK_s értékei környékén.



1. ábra

Galanin peptidek ionizáltsági állapotának függése az oldat pH-jától

— hGAL[1-30], — hGAL[1-19], — hGAL[1-16], — hGAL[17-30], — hGAL[26-30]

Peptidek vizsgálatában a kapilláris elektroforézis nem vált annyira elterjedtté, mint pl. a fehérjék analitikájában (különböző CE módszerekkel karakterizálhatók az egyes fehérjék, pl. rekombináns fehérjék), kimutathatók izoformáik, mennyiségileg mérhető expressziós szintjük, meghatározhatók kölcsönhatásaik stb.), de mint azt a rendszeresen megjelenő összefoglaló cikkek is igazolják [41, 42], a kutatásban való használata sokrétű. Az alábbi felsorolás a teljesség igénye nélkül a peptidkutatás azon területeit mutatja be, ahol ma a kapilláris elektroforézist használják:

A., Analízis

- minőségellenőrzés, tisztaságmeghatározás,
- peptidek azonosítása biológiai mátrixból,
- peptidek kémiai és enzimatis reakcióinak, fizikai változásainak monitorozása,
- aminosav- és szekvencia-analízis,

- peptidtérképezés,
- királis analízis, sztereoiszomerek elválasztása

B., Mikropreparatív elválasztások

C., Peptidek fizikokémiai karakterizálása

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 nagy hatékonyságú elválasztását, érzékeny detektálását, azonosítását és kvantitatív meghatározását. Az eredményeken keresztül segített és segít megérteni különböző biológiai folyamatokat, és megindította az utat a peptid és fehérje-alapú diagnosztikumok, gyógyszerek kifejlesztéséhez.

Ebben a fejezetben biológiailag aktív peptidek előállításáról, tisztításáról, nagyhatékonyságú elválasztástechnikai minősítésükről és biológiai tulajdonságaik vizsgálatáról számolok be.

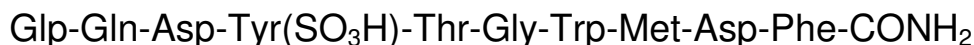
2.2. CÉLKITŰZÉSEK

- A., HPLC kontroll-módszer kifejlesztése caerulein szintézisének optimalizálására; a caerulein preparatív kromatográfiás tisztítása és minőségellenőrzése nagyhatékonyságú elválasztási módszerekkel.
- B., Szintetikus peptid toxinok (charybdotoxin, iberiotoxin) diszulfidhídjaik kialakítása HPLC-kontroll mellett; preparatív kromatográfiás tisztításuk, minőségellenőrzésük nagyhatékonyságú elválasztási módszerekkel.
- C., Szintetikus galanin analógok és fragmensek preparatív kromatográfiás tisztítása, minőségellenőrzése nagyhatékonyságú elválasztási módszerekkel, fizikai-kémiai paraméterek vizsgálata nagyhatékonyságú elválasztási eljárásokkal.
- D., Foszforilált peptidek előállítása, tisztaságvizsgálata és kinázok aktivitásának meghatározása kapilláris elektroforetikus módszerekkel.
- E., Tumorellenes hatással rendelkező luteinizálóhormon-felszabadító hormon analógok (luteinizing hormone-releasing hormone, LH-RH vagy gonadotropin-releasing hormone, GnRH) szintézise. Preparatív és analitikai HPLC alkalmazása tiszta termékek előállítására, biológiai hatásuk vizsgálata.

2.3. BIOLÓGIAILAG AKTÍV PEPTIDEK ELŐÁLLÍTÁSA, ANALÍZISE ÉS HATÁSAINAK VIZSGÁLATA

2.3.1. Caerulein [II]

A caeruleint (ceruletid) 1967-ben izolálták először ausztrál zöld levelibéka (*Litoria caerulea*, korábban *Hyla caerulea*) bőréből [43]. A tíz aminosavból álló peptid, szerkezetét és hatását tekintve hasonló a hasnyálmirigyolecisztokinin peptidjéhez:



2. ábra

A caerulein aminosavszekvenciája

Stimulálja a gyomor, az epe és a hasnyálmirigy kiválasztását és bizonyos simaizmok működését [44]. Gyulladásos folyamatokat indít, így pl. hasnyálmirigy-gyulladást indukál, ezért használatos az epehólyag, az epeutak és az emésztőrendszer radiológiai diagnosztikájában, hasnyálmirigy működési zavarainak diagnosztikájában, ill. a paralitikus ileum posztoperatív kezelésében [45].

Szintetikus előállítására a benne lévő érzékeny aminosavak (Met, Trp), a két szulfatálható csoport (Thr, Tyr) együttes jelenléte és a szulfátészter labilitása miatt nehéz, ezért előállítására számos stratégiát kipróbáltak [46, 47], de ezek nem vezettek jó hozamú módszerhez.

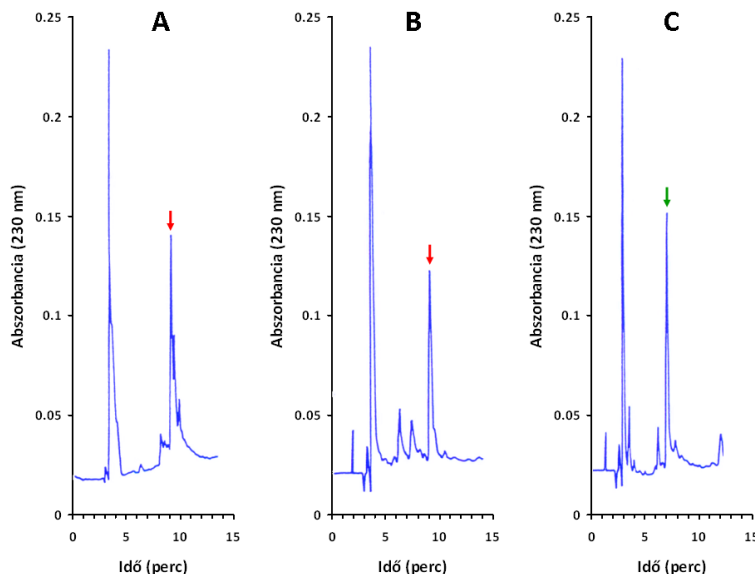
Kísérletek

A caerulein előállítására két klasszikus oldatfázisú és három szilárdfázisú stratégia kipróbálása után legjobban a szilárdfázisú szintézist követő szulfatálás vált be (MBHA-polimer, Boc-kémia). A szintézis kulcslépése a Tyr-szulfátészter kialakítás, melyet egy új reagens, a piridinium-acetilszulfát segítségével végeztük el [48]. A szulfatálást a közbenső, nem-szulfátészter peptid preparatív tisztítása után végeztük el. A végső HPLC tisztítást KNAUER HPLC készüléken, gradiens eluensrendszer alkalmazásával hajtottam végre. A termék tisztaságát fordítottfázisú HPLC-vel és kapilláris elektroforézissel (BioFocus 3000 készülék, BioRad, USA) határoztam meg.

Eredmények és megbeszélésük

A caerulein szintézisére sem az oldatfázisú fragmentskondenzáció (6+2+2, ill. 1+1+2+2+2+2), sem a Fmoc-Tyr(SO₃Na)-OPFP felhasználásával történő szilárdfázisú szintézis nem vezetett megfelelő mennyiségű és tisztaságú termékhez, ezért a Tyr-

szulfátészter kialakítását a szilárdfázisú szintézissel elkészített és megtisztított peptidlánc utólagos szulfatálásával végeztük el. A DTT hozzáadása a hasító elegyhez megvédte a Met-t és Trp-t az oxidációtól, könnyebben tisztítható átmeneti terméket eredményezett (3. ábra).



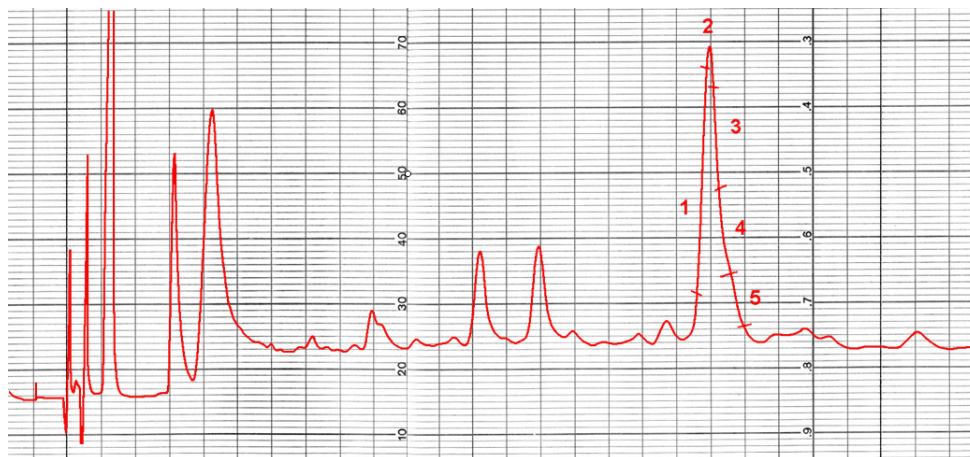
3. ábra

Caerulein-szintézis nyersteérékének kromatogramjai: Boc-védőcsoport eltávolítása (A) DTT nélküli, (B) DTT-t tartalmazó TFA oldattal. Caerulein szulfátészter-képzés reakciójának nyersteéréke (C)
4 x 250 mm LiChrosorb RP-18 oszlop, 0,2% ecetsav-acetonitril eluens, áramlási sebesség 1 ml/perc, 230 nm
(caerulein: piros nyíl, caerulein-szulfátészter: zöld nyíl)

A peptidszintézis után, de a szulfatálás előtt a nyersteérék tisztítását 100 mg-os mennyiség esetén 16 x 250 mm-es tisztítását HPLC (4. ábra), míg grammos tételeknél BÜCHI MPLC rendszeren: 30 x 300 mm-es, állófázissal (Vydac C18, 15-30 μm , 300 Å) házilag töltött oszlopon 0,05 M TEAP (pH 6,5) – acetonitril eluenssel végeztem. A szulfátészter-csoport különleges savérzékenysége miatt olyan HPLC-rendszert dolgoztam ki, amely lehetővé tette a peptid-szulfátészter bomlás nélküli tisztítását (0,2% ecetsav-acetonitril eluensrendszer). A kétlépcsős nagyhatékonyságú kromatográfiával > 98% tisztaságú caeruleint állítottunk elő (5. ábra). Az analitikai HPLC-vel végzett vizsgálat alapján a 3. frakció bizonyult a legtisztábbnak, míg a micelláris elektrokinetikus kromatográfiával (MEKC) ebben a mintában is mutatott ki egy lassabban vándorló szennyezést.

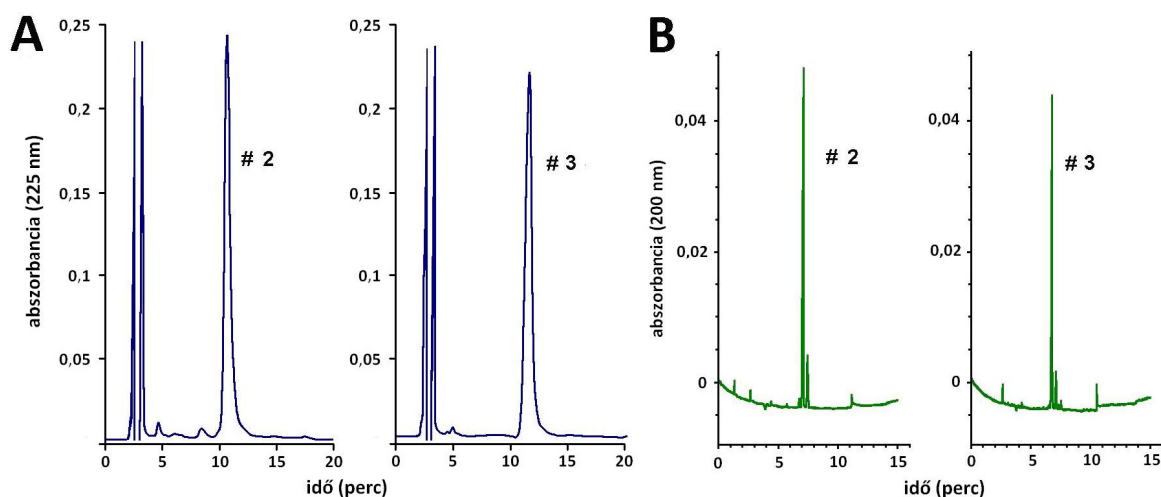
A termék RP-HPLC retenciós ideje és különböző tesztekben mutatott biológiai tulajdonságai megegyeztek a kontrollként alkalmazott TAKUS[®] inj. (Farmitalia, Olaszország) preparátummal.

A caerulein előállítására kidolgozott módszerünk olyan jól sikerült, hogy később epehólyag-diagnosztikai célra 10 g-os tételben is elkészítettük.



4. ábra

Caerulein nem-szulfátészter peptid preparatív tisztítása (a számok a gyűjtött frakciókat jelzik).
16 x 250 mm Lichrosorb RP-18 (10 μ m, 100 Å), 0,2% ecetsav – acetonitril, 2 ml/perc, 220 nm



5. ábra

A caerulein-szulfátészter preparatív kromatográfiás tisztítási frakcióinak (#2, #3) ellenőrzése

(A) analitikai HPLC-vel és (B) MEKC-vel

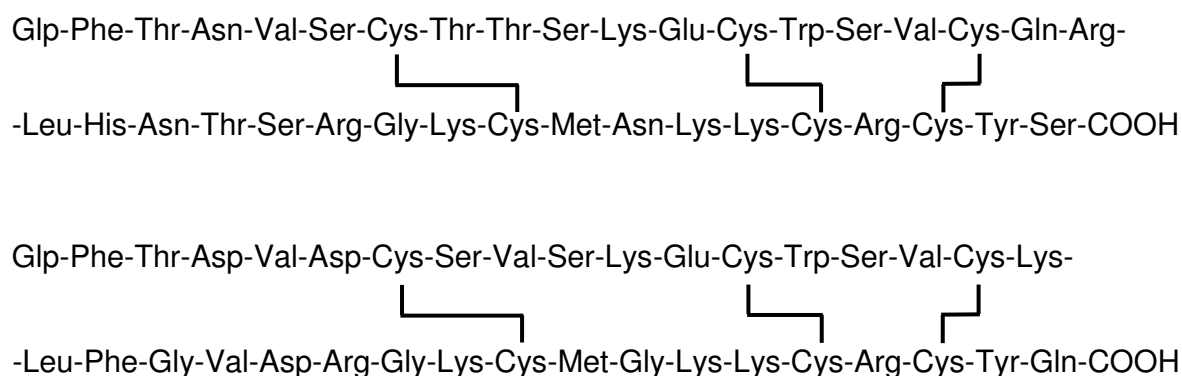
HPLC: 4 x 250 mm LiChrosorb RP-18 (10 μ m), eluens 0,2% ecetsav 35% acetonitril, 1 ml/perc,
MEKC: 50 μ m x 50 cm kvarc kapilláris, 0,01 M nátriumborát + 0,005 M foszfát + 0,05 M SDS pH 8,0, 18 kV

2.3.2. Peptid toxinok [III]

A skorpiók az egyik legősibb, több, mint 400 millió éves állatcsoport a Földön. Érdekes élőlények, különlegesen hosszú evolúciós idejük, orvosi felhasználásuk és méregmirigyük miatt. A skorpióméreg számos biológiailag aktív komponenst, így enzimeket, peptideket, nukleotidokat, lipideket, mukoproteineket, biogén aminokat és egyéb más anyagot tartalmaz. Egyes fajok csípése csak a gerinctelen állatokat öli vagy bénítja meg; míg egy másik fajta skorpióméreg az emberre is halálos lehet, mert megbénítja a szívet és a mellkasi

izmokat ellátó idegeket. A skorpióméreg legjobban tanulmányozott csoportja a peptidtoxinok, melyek felismerik a sejtmembrán ioncsatornáit és receptorait. A toxinoknak négy csoportjuk ismert, melyek a K^+ , a Na^+ , a Cl^- és a Ca^{2+} csatornákkal lépnek kölcsönhatásba. Közülük jól ismertek az először *Leiurus quinquestriatus*-ból izolált charybdotoxin és a *Buthus tamulus*-ból izolált, vele 68% homológiát mutató iberiotoxin. Mindkét peptid specifikusan blokkolja a K^+ -csatornákat, azok intracelluláris részéhez kapcsolódva megakadályozzák az ionok transzportját. A Ca-aktivált K^+ -csatornák fontos szerepet játszanak az artériás nyomás szabályozásában, a sima és harántcsíkolt izmokban, blokkolásuk az idegrendszerben nagyfokú idegizalmat hoz létre.

A legtöbb skorpiótoxinnak hasonló, konzervált szerkezete van, melyben egy α -hélixet és 2-3 β -réteg szerkezetű antiparalel peptidláncot 3-4 diszulfid híd tömör globuláris szerkezetűvé alakít. Mind a charybdotoxin, mind az iberiotoxin 37 aminosavból álló minifehérje (6. ábra), melyben a harmadlagos szerkezetet 3 diszulfidhíd alakítja ki [49].



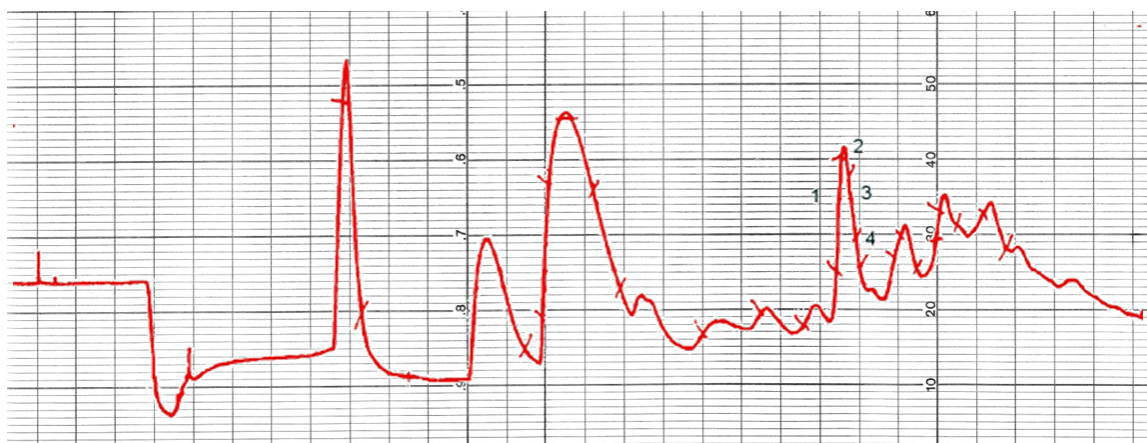
6. ábra

A charybdotoxin (fenn) és az iberiotoxin (lenn) aminosavszekvenciája és a diszulfidhidak elhelyezkedése természetes toxinokban

Bár a peptidek szilárd fázisú szintézisére számos próbálkozás történt, a drága Fmoc-stratégián túl a leírt módszerek hatékonysága meglehetősen alacsony (<1%) volt [50]. Peptideket lehet jobb termeléssel előállítani, azonban a biológiailag aktív, 3 diszulfidhidat tartalmazó termék elkészítése igazi kihívás volt. Vita és mtsai a charybdotoxin és fragmenseinek tisztaságellenőrzésére kapilláris zónaelektroforézist használtak [51]. A skorpiótoxinok fontos farmakológiai segédeszközök különböző szövetek Ca-aktiválta K^+ -csatornák szabályozási mechanizmusának felderítésében, ezért biológiai kísérletekhez előállítottuk a két toxint.

Kísérletek

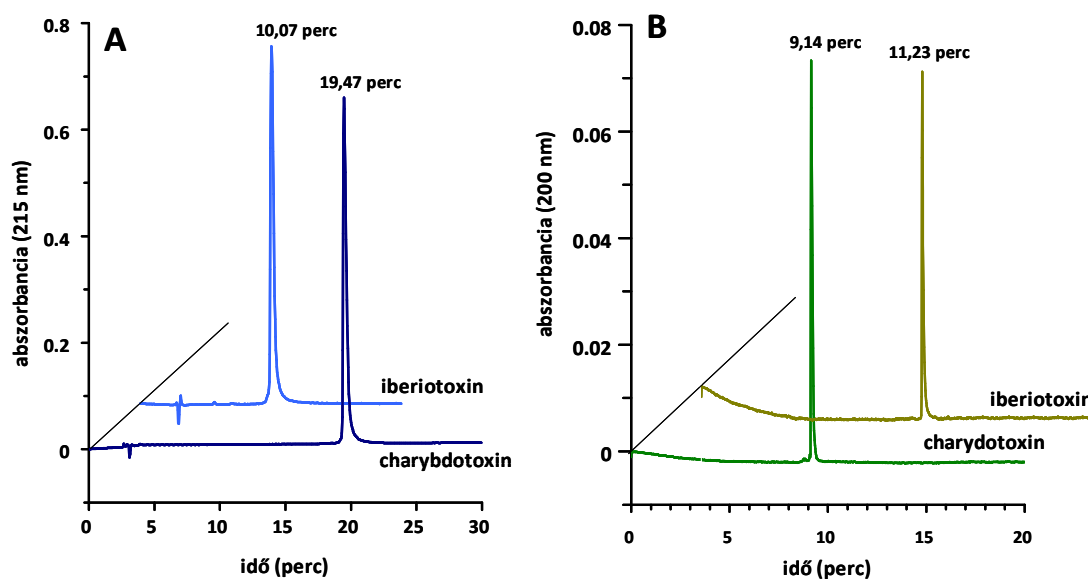
A peptideket PAM gyantán Boc-startégiával jó hatásfokkal szintetizáltuk, majd kidolgoztunk egy eljárást a diszulfidhidak kialakítására: a peptideket (0,05 M) 2 M karbamid, 0,1 M glicin és 0,1 M NaCl 8,7 pH-jú oldatában egy éjszakán át kevertetve levegőn oxidálva zártuk az SH-csoportokat diszulfidhíddá. A nyersterméket preparatív RP-HPLC-vel tisztítottuk (7. ábra), majd a termékek minőségét analitikai RP-HPLC-vel, kapilláris zónaelektroforézissel és FAB-tömegspektrometriával ellenőriztük.

**7. ábra**

A charybdotoxin preparatív kromatogramja (a számok a gyűjtött frakciókat jelzik).
 47 x 300 mm PrePak® C18 (15-20 μ m, 300 Å), eluens A: 0,1% TFA, eluens B: 0,1% TFA-80% acetonitril,
 Gradiens: 13-26% B/32 perc, áramlási sebesség 80 ml/perc, 220 nm

Eredmények és megbeszélésük

A szulfhidril-csoportok diszulfidhíddá történő zárását híg oldatban (0,05 M, 2 l) végeztük, ezért a reakcióelegyet nem injektáltuk, hanem rápumpáltuk a preparatív HPLC oszlopra. A megtisztított peptidek mindkét minőségellenőrzési eljárással > 99% tisztaságúnak bizonyultak (8. ábra), a standardokkal azonos retenciót mutattak, tömegük az elméletileg számolttal egyezett, valamint nyúl aorta-teszten a természetes peptidtoxinokkal azonos aktivitásúnak mutatkoztak. Bár külön szerkezetigazoló vizsgálatokat nem végeztünk, a fenti bizonyítékok arra engedtek következtetni, hogy a diszulfid-hidak a természetes peptidekben találhatóhoz hasonlóan alakultak ki.



8. ábra

A charybdotoxin és az iberiotoxin A: HPLC kromatogramja (—, —) és B: CZE elektroferogramja (—, —)
 HPLC: Vydac C18 (5 μ m, 300 Å) oszlop, eluens A: 0,1% TFA, eluens B: 0,1% TFA-80% acetonitril,
 gradiens: 6-21% B/20 perc a charybdotoxin, 16,5-30%B/20 perc az iberiotoxin analíziséhez
 CZE: 50 μ m x 50 cm kvarc kapilláris, 0,1 M foszfát puffer pH 2,5), 18 kV

2.3.3. Galaninok [IV-X]

A galanin egy 29/30 aminosavból álló multifunkcionális neuropeptid, melyet először sertés vékonybélből izoláltak [52]. Szerkezetét 1983-ban határozták meg, s nevét is ekkor adták: N-terminális glicint és C-terminálisán alanint tartalmaz. Azóta mintegy 20 gerinces állatfajból izoláltak hasonló hatású peptidet (patkány, birka, szarvasmarha, csirke, alligátor stb.) [53]. A humán galanint 1991-ben izolálták, s mindjárt két, biológiailag aktív formáját tudták kémiaiileg jellemezni [54]. A *GAL*-gén az emlősökben erősen konzervált, mintegy 85% homológiát mutat, ebből következik, hogy a különböző fajokból származó galanin peptidek is igen hasonlóak [55]. A humán galanin kivételével mindegyik 29 aminosavat tartalmazó lineáris polipeptid, melynek C-terminálisa amidált. A kisebb humán galanint 19, míg a nagyobb 30 aminosav építi fel, s ez utóbbi szabad C-terminális karboxilcsoporttal rendelkezik. Három faj kivételével az N-terminális 15 aminosav mindenhol azonos, míg a C-terminális rész több-kevesebb eltérést mutat (9. ábra).

A galanin a számos szövetben kimutatható, legnagyobb mennyiségben a központi és perifériális idegrendszerben és a gasztrointesztinális traktusban. Az agy idegsejtekben együtt lokalizálódik több neurotranszmitterrel (acetilkolin, szerotonin, norepinefrin) és más

neuromodulátorral (Neuropeptid Y, P-anyag (Substance P), vazóaktív intesztinális peptid (VIP)).

	1	5	10	15	20	25	30																												
humán GAL[1-30]OH	G	W	T	L	N	S	A	G	Y	L	L	G	P	H	A	V	G	N	H	R	S	F	S	D	K	N	G	L	T	S	-	C	O	O	H
csirke GAL[1-29]NH ₂	G	W	T	L	N	S	A	G	Y	L	L	G	P	H	A	V	<u>D</u>	N	H	R	S	F	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>H</u>	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>T</u>	-	C	O	N	H	₂
sertés GAL[1-29]NH ₂	G	W	T	L	N	S	A	G	Y	L	L	G	P	H	A	<u>I</u>	<u>D</u>	N	H	R	S	F	<u>H</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	-	C	O	N	H	₂
patkány GAL[1-29]NH ₂	G	W	T	L	N	S	A	G	Y	L	L	G	P	H	A	<u>I</u>	<u>D</u>	N	H	R	S	F	S	D	K	H	G	L	T	-	C	O	N	H	₂

9. ábra

A humán-, a csirke-, a sertés- és patkány galaninok aminosavszekvenciája

Sertés és patkány galaninnal végzett biológiai kísérletek bizonyították, hogy a galaninok széleskörű endokrin és idegrendszeri hatással rendelkeznek [56]. Szabályozzák pl. bizonyos peptidhormonok (inzulin, gasztrin, szomatosztatin, növekedési hormon, prolaktin) és neurotranszmitterek (acetilkolin, szerotonin, dopamin stb.) felszabadulását, hiperpolarizálják az idegsejteket, hatással vannak az alvásra, táplálékfelvételre, a fájdalomküszöbre, a kognitív funkciókra, szabályozzák a simaizmok összehúzódását a gasztrointesztinális és húgyúti rendszerben, ami azt jelzi, hogy a galanin fontos szerepet játszik az izmok és endokrin sejtek idegi szabályozásában.

Az aminosavszekvenciában lévő kis különbségek messzemenő hatással vannak a biológiai aktivitásukra, pl. a sertés és a patkány galanin gátolja a glükóz-indukálta inzulin-szekréciót patkányban és kutyában, azonban nem befolyásolja a szervezet inzulinkiválasztását emberben. Ez a jelenség is azt támasztja alá, hogy célszerű a galaninokat (a többi szabályzó peptidhez hasonlóan) autológ szervezetekben vizsgálni.

A kutatók, különösen a neuroendokrinológusokat érdekelte a hGAL különböző fiziológiai, farmakológiai és pszichiátriai hatásai, ezért szintetizáltuk a humán galaninok teljes szekvenciáját tartalmazó peptideket, N- és C-terminális szegmenseit, a teljes csirke-, sertés- és patkány galanint és azok N- és C-terminális darabjait. A szerkezet-hatás összefüggések vizsgálatára a fentiekén kívül a galaninnak még kb. 40 analógját állítottuk elő.

Kísérletek

A peptideket szilárd fázisú peptidszintézissel 1% Merrifield, MBHA és Tentagel gyantákon állítottuk elő szükségszerűen Boc- vagy Fmoc-stratégiát alkalmazva. A termékeket esetenként Sephadex G-25 oszlopon, de leggyakrabban szemipreparatív RP-HPLC-vel

tisztítottuk. A peptidek tisztaságát analitikai RP-HPLC rendszeren és két kapilláris elektroforetikus rendszerben ellenőriztem, szerkezetüket aminosav-analízissel, FAB-, ill. ESI-tömegspektrometriával azonosítottuk, biológiai aktivitásukat több rendszerben vizsgáltuk [57-59].

Eredmények és megbeszélésük

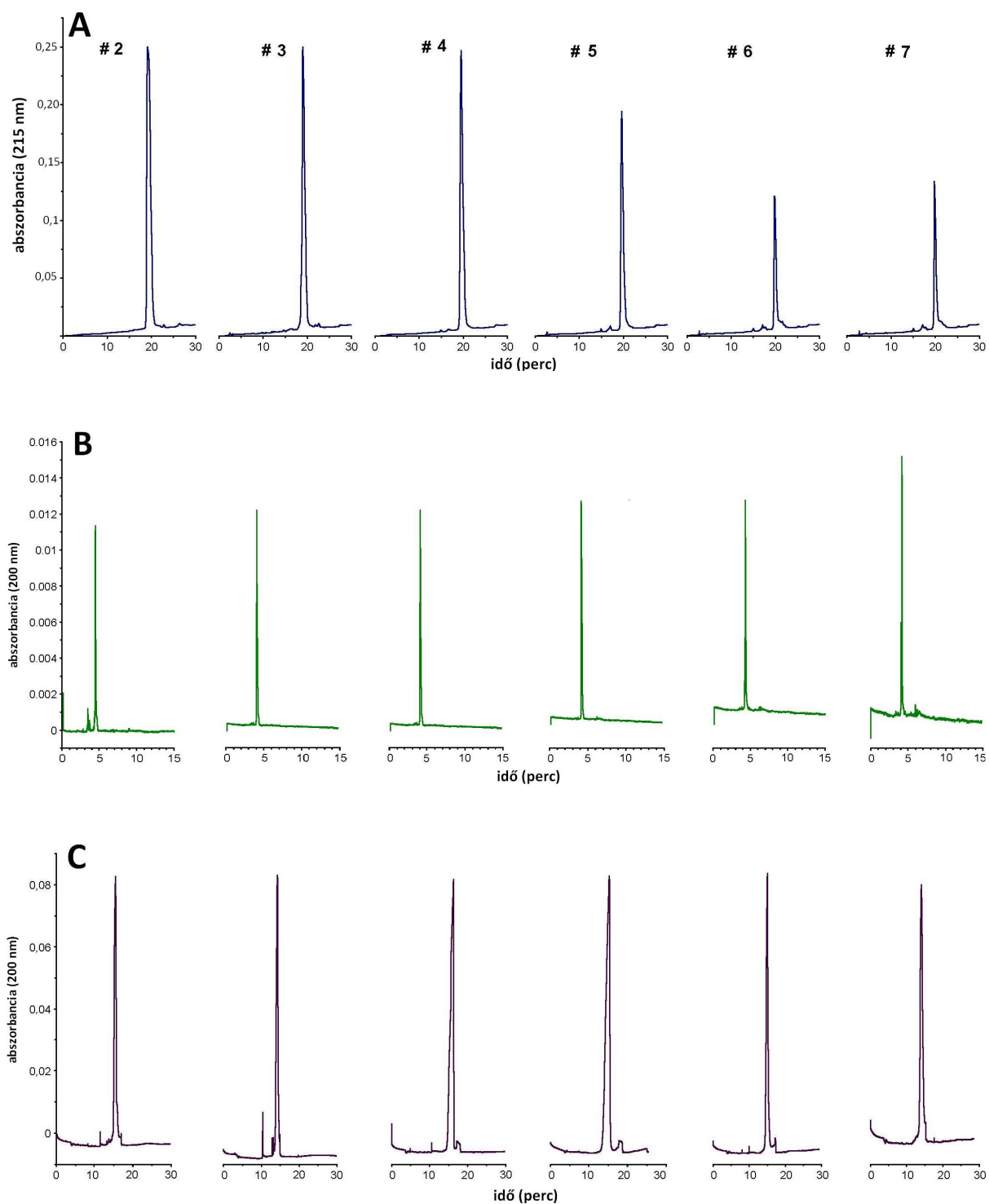
A Sephadex G-25 oszlopon végzett kromatográfiát követő szemipreparatív vagy kétszeres szemipreparatív RP-HPLC tisztítás csaknem minden esetben nagy tisztaságú peptidet eredményezett, amint az a frakciók ellenőrzésére szolgáló elválasztástechnikai módszerekkel kapott kromatogramok és elektroferogramok bizonyítanak (10. ábra). Néhány humán galanin peptid HPLC és MEKC kromatogramjai és CZE elektroferogramja a 11. ábrán láthatók. Micelláris elektrokinetikus kromatográfiával, – melyben az elválasztás a mintának a micella és a puffer közötti megoszlásán alapul – hasonló kromatogramot kaptam, mint a fordítottfázisú HPLC-ben, ami a két módszer rokonságára utal.

A humán, sertés, patkány és csirke galaninok, valamint N- és C-terminális fragmenseik összehasonlító kromatográfiás és kapilláris elektroforetikus vizsgálatának eredményei, valamint görcselőidéző hatása a Függelék 1. táblázatában láthatók. A központi idegrendszeri hatásukról (acetilkolin felszabadulás) [58], oxitocin- és vazopresszin-elválasztást szabályzó hatásukról [59] munkatársaink számoltak be.

A peptidek fordított fázisú kromatográfiás oszlopon mutatott viselkedését elsősorban hidrofóbicitásuk befolyásolja, ami az egyes aminosavak hidrofóbicitásainak összege. Az aminosavak ezen tulajdonságainak számszerűsítésére nagyon sok kísérletes és statisztikai módszer született (fázisátmenetek szabadenergiaváltozásának meghatározása, folyadék-folyadék megoszlás, felületi feszültség mérése, RP-HPLC és más kromatográfiás technikák, egyéb fizikai paraméterek mérése, hozzáférhető felület számítása stb.) [60, 61], melyek aminosavakat és peptideket különböző szempontok szerint vizsgálva saját hidrofóbicitási skálákat állítottak fel [62-64]. Az egyes aminosavak oldalláncuktól függően eltérő mértékben járulnak hozzá a peptidek hidrofóbicitásához, ezért azok összege függ a peptidet alkotó aminosavak minőségétől.

A HPLC-ben a retenciós idő megbecsléséhez [IX] gyakran alkalmazott Bull és Breese [65], Meek [66], Rekker [67] stb. skálákat felhasználva azt tapasztaltuk, hogy a peptidek hidrofóbicitása általában növekszik a peptid tagszámának növekedésével. Galanin peptideket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy azok retenciós ideje jó korrelációt mutatott a

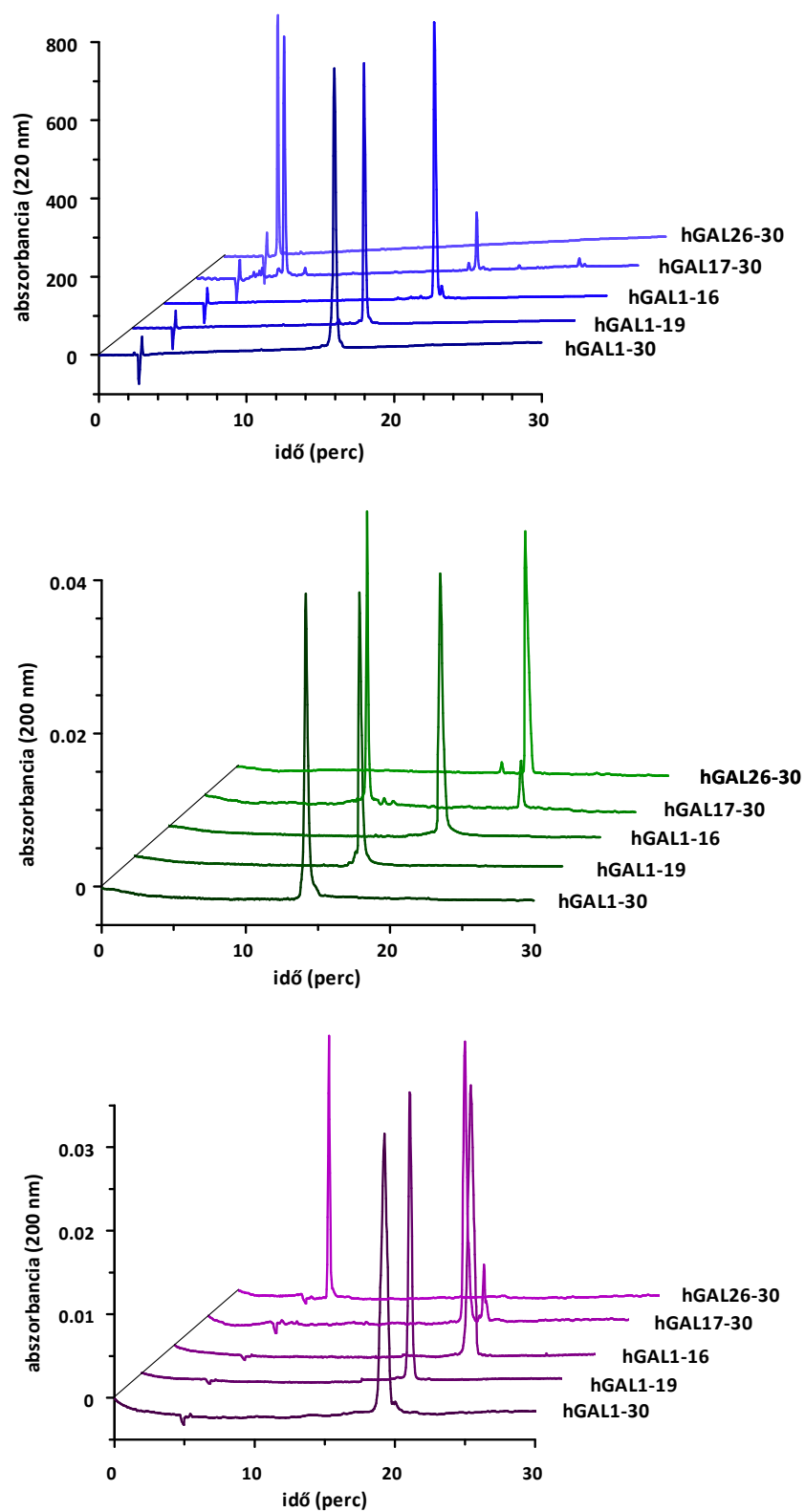
dc_272_11



10. ábra

hGAL[1-19] preparatív tisztítási frakcióinak (#2, #3, #4, #5, #6, #7) analitikai HPLC kromatogramjai (A), CZE (B) elektroferogramjai, és MEKC (C) kromatogramjai,
HPLC: 4 x 250 mm Eurosil-Bioselect 300 C-18 (5 μ m), eluens A: 0,1% TFA, B: 0,1% TFA 80% acetonitrilben, gradiens: 10-70%B/30 perc, 1 ml/perc,
CZE: 25 μ m x 24 cm kvarc kapilláris, 0,1 M foszfát puffer, pH 2,5,
MEKC: 50 μ m x 50 cm kvarc kapilláris, 0,01 M nátriumborát + 0,005 M foszfát + 0,05 M SDS pH 8,0, 18 kV,

dc_272_11

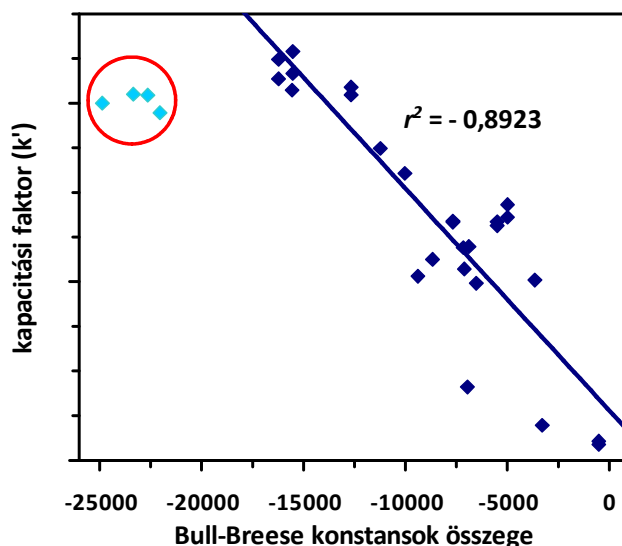


11. ábra

Humán galanin és fragmenseinek analitikai HPLC (A) és MEKC (C) kromatogramjai és CZE elektroferogramjai (B)

HPLC, CZE: lásd Függelék 1. táblázat, MEKC: 50 μ m x 50 cm kvarc kapilláris, 0,01 M borát-0,005 M foszfát puffer-0,005 M SDS (pH 8,0), 15 kV

hidrofóbicitással (12. ábra). A peptidek méretének növekedésével romlik a korreláció a retenció és a hidrofóbicitás között, mert a peptidekben másodlagos, harmadlagos szerkezeti formák alakul(hat)nak ki. Ez magyarázhatja azt, hogy az 1-29, 1-30 galaninok az összes többi peptidtől elkülönülve, egy csoportban, a 12. ábra bal felső sarkában helyezkednek.



12. ábra

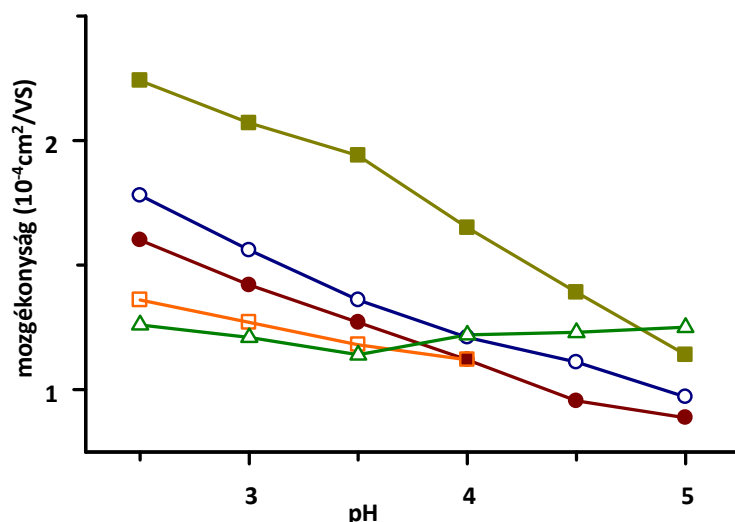
Összefüggés a galanin peptidek retenciója (Függelék 1. Táblázat) és a peptidek aminosavainak összegzett Bull-Breese konstansai között

A peptidek elúciós sorrendjét (amely arányos a hidrofóbicitásukkal) a peptidek tulajdonságaitól függetlenül számos paraméter, így a szilikagél fajlagos felülete, pórusátmérője, borítottsága, az elúciós puffer típusa, pH, a hőmérséklet stb. befolyásolják.

A peptidek elektroforetikus mozgékonyságának pH-függését vizsgálva öt humán galanin peptidet analizáltam 6 különböző pH értékű pufferben (13. ábra). A több mint 1 pozitív töltést hordozó peptideknél a mozgékonyság a pH növelésével folyamatosan csökken, míg a hGAL 26-30-é nem változik. A vizsgálatból is látszik, hogy peptidek kapilláris zónaelektroforetikus elválasztására a savas pH (pH 2-3) kedvező, mert ilyen körülmények között az összes amino- és karboxilcsoport protonálva van, aminek következtében mindegyik peptid a katód felé vándorol.

A pH nemcsak a peptidek nettó töltésére van hatással, hanem befolyásolja az elektroendozmotikus áramlást is. Alacsony pH-n a kvarc kapilláris falán a szilanolcsoportok protonáltak, melynek hatására az EOF csaknem nulla. A pH növelésével változik a kapilláris felülete, a szilanol OH-csoportok disszociálnak, melynek következtében az EOF növekszik, de az csak pH=4 felett válik jelentőssé. Másrészt a pH emelésével megnő a peptid és a

kapilláris fala közötti ionos kölcsönhatás lehetősége. Ennek kiküszöbölésére a kapilláris belső falát szokás bevonni valamilyen hidrofób polimerrel (pl. poliakrilamid, polivinil-alkohol stb.).



13. ábra

Humán galanin és fragmensek elektroforetikus mozgékonyágának függése az elektrolit kémhatásától (0,1 M nátrium-foszfát, pH 2,5-5,0)

— hGAL[1-30], — hGAL[1-19], — hGAL[1-16], — hGAL[17-30], — hGAL[26-30]

Az elektroforetikus mozgékonyág függ a peptidek nagyságától, alakjától és töltésétől. Két modellben [68, 69] vizsgálva a humán galanin peptideket, alacsony pH-n jó lineáris korrelációt találtam a fenti fizikai-kémiai paraméterek, úgymint az aminosavak száma (n), a peptidek molekulatömege (M) és töltése (q), valamint az elektroforetikus mozgékonyág között: $\ln[q+1]/n^{0.43}$ összefüggés esetén $r^2 = 0,9958$, $q/M^{2/3}$ hányadost alkalmazva pedig $r^2 = 0,8973$. Az arányosság a pH növelésével csökkent, s pH 4 fölött el is tűnt [IV].

2.3.4. Foszfopeptidek [XII-XIV]

A sejtfolymatok szabályozása a membránon történő jelátviteli mechanizmusokon keresztül történik, mely magában foglalja különféle enzimek közvetlen vagy közvetett módon történő aktiválását. A jelátviteli folyamatok során aktiválódó enzimek közé tartoznak a fehérjék reverzibilis foszforilációját katalizáló protein kinázok és foszfatázok, melyek számos fehérje foszforilációs szintjének kialakításában játszanak szerepet, ezzel pl. a metabolikus folyamatokat, a sejtciklust, a sejtek alakváltozását, kontraktilitását, migrációját, a sejtnövekedést és differenciálódást, valamint a sejthalál folyamatát is szabályozzák.

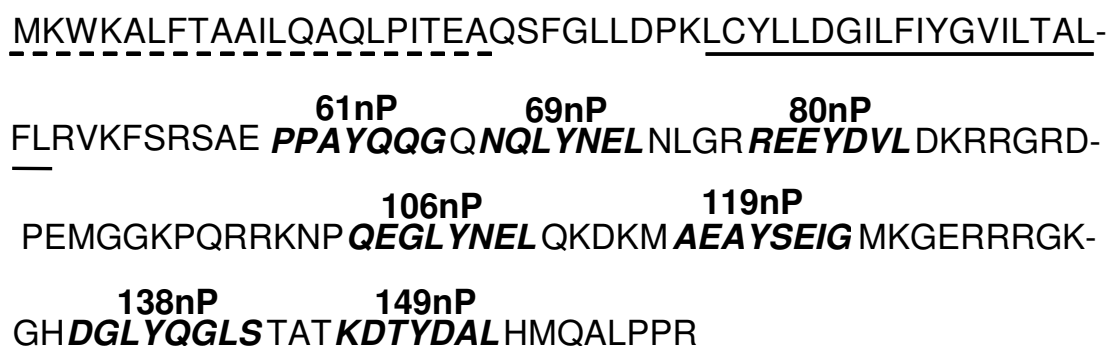
A humán proteom fehérjéinek több, mint 1/3 része foszfoprotein és humán genom kb. 5%-a a fehérje foszforiláló kináz és defoszforiláló foszfatáz családok fehérjéit kódolja. Ezek az

enzimek megnövelhetik vagy éppen csökkenthetik más enzimek, receptorok, szabályzó fehérjék, transzkripció faktorok aktivitását, kijelölhetnek fehérjéket lebontásra, szabályozzák bizonyos fehérjék szubcelluláris kompartmentek közötti mozgását, gátolhatják vagy elősegíthetik a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat. Ezek a komponensek vagy folyamatok sok esetben részei különböző jelátviteli folyamatoknak. Így a kinázok vagy foszfatázok szintjének, aktivitásának vagy lokalizációjának változása hatással van ezekre a folyamatokra.

A humán proteomban több mint 500 fehérje kináz katalizálja a foszfátcsoport ATP-ről Ser/Thr és Tyr aminosavakra történő átvitelét. Mivel a kinázok sok életfolyamatban kulcsszerepet játszanak, ezért a legfontosabb gyógyszer-célponttá váltak.

A kinázok/foszfatázok aktivitásának meghatározására számos módszer létezik, ezek egyike a célfehérje potenciális foszforilálási helyeit magában foglaló peptidek, foszfopeptidek analízise.

Immunológiai folyamatokban a T-sejt receptorokon keresztül megvalósuló jelátvitelben a T-sejt receptor (TCR)/CD3 komplex ζ -lánc játszik központi szerepet [70]. A receptor stimulálása után a ζ -lánc intracelluláris szakaszának számos Tyr-je foszforilálódik. Sokáig nem volt ismert, hogy a foszforilálást milyen kinázok katalizálják és a peptidlánc 7 tirozinja közül melyek lépnek reakcióba [71]. A T-sejt aktiválás csökkentéséhez a fehérje defoszforilálására van szükség, azonban annak helye, ill. foszfatáz enzimje sem volt ismeretes. Ezen kérdések tanulmányozásához szintetizáltuk a ζ -alegység 7 rövid, 1-1 Tyr-t tartalmazó szakaszát (61nP, 69nP, 80nP, 106nP, 119nP, 138nP, 149nP) (14. ábra), valamint a megfelelő foszfo-Tyr peptideket (61P, 69P, 80P, 106P, 138P, 149P), majd biokémiai kísérletekben vizsgáltuk, hogy milyen kinázok, ill. foszfatázok okoznak foszforiláltsági-szint változást ezen peptideknél.



14. ábra

TCR/CD3 komplex ζ -láncának aminosavszekvenciája és szintetizált fragmansei (*vastagított dőlt betűvel*)

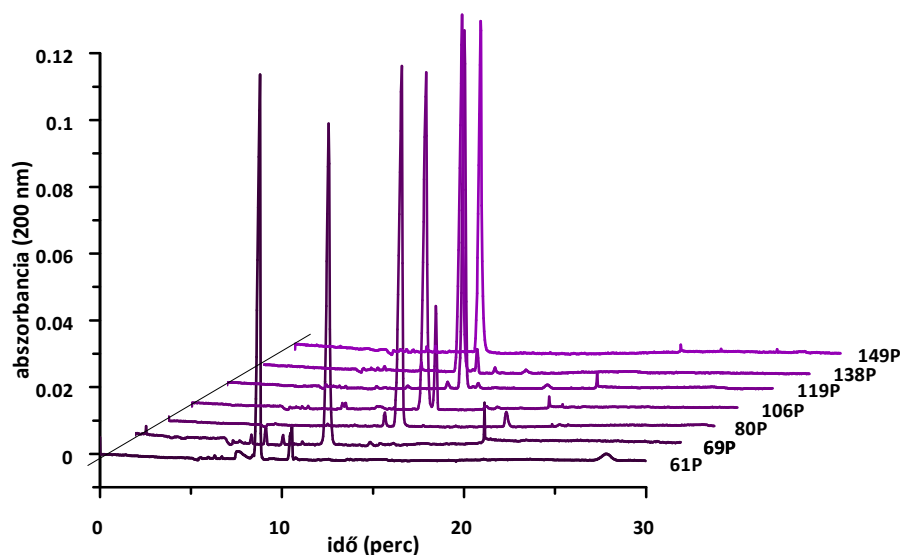
Foszfopeptidek kémiai előállítása a peptidek szekvenciájától függően különböző szintézis-stratégiák kidolgozását kidolgozását teszi szükségessé [72].

Kísérletek

A TCR/CD3 peptidek szintézise nem (Boc- és Fmoc-stratégia, TMBHA, ill. MBHA gyantán, DCC kapcsolás), azonban a foszfopeptidek előállítása számos nehézségbe ütközött. A megfelelő reagens (foszforamidit) megtalálása után a peptid gyantán, vagy hasítás utáni foszforilálás (globális módszer) vezetett eredményre [73]. A peptidek szemipreparatív RP-HPLC-s tisztítása után a végtermékek tisztaságát analitikai RP-HPLC-vel és kapilláris elektroforézissel (CZE és MEKC) ellenőriztem (15. ábra). A kapilláris elektroforézis kiváló módszer foszfopeptidek analízisére is [74].

Eredmények és megbeszélésük

Bár az alkalmazott RP-HPLC rendszerben az összes foszfopeptidünk tisztának bizonyult (> 95%), néhány esetben a MEKC kimutatott alacsony mennyiségű (1-10%) szennyezést.



15. ábra

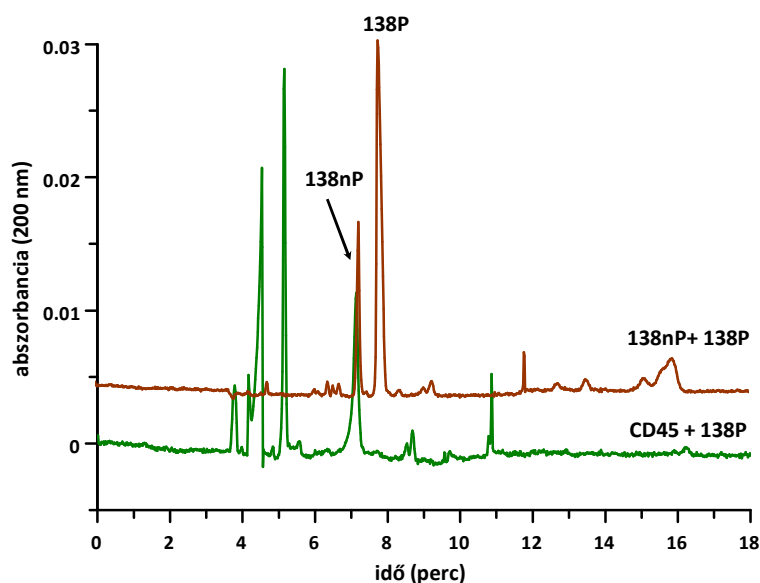
Foszfopeptidek MEKC kromatogramjai

MEKC: 50 μ m x 50 cm kvarc kapilláris, 0,05 M SDS-0,01 M borát-0,005 M foszfát puffer (pH 8,5), 15 kV

A T-sejt aktiválása után a ζ -lánc foszforilációjában valószínűleg az *src* tirozin-kináz család p59^{fyn} és p56^{lck} tagjai, ill. a *syk* család (ZAP 70) játszanak szerepet. Kísérleteink azt mutatták, hogy 6 rövid peptidünk, melyek a fehérje konzervált régiójából származnak, szubsztrátjai az

src kinázoknak, míg a 61nP peptid, mely nem konzervált szakaszban helyezkedik el, *in vitro* nem célpontja az az *lck* és *fyn src* kinázoknak.

A ζ -lánc defoszforilálásáért a tirozin-foszfataáz aktivitással rendelkező CD45 (a limfocita sejtfelszíni fehérjéje) tűnik felelősnek. Foszforilezett peptidjeinket szubsztrátként használva a kapilláris elektroforetikus eredményeink azt mutatták, hogy a CD45 defoszforilálja a ζ -oligopeptideket (pl. a CD45 foszfataázzal együtt inkubált 138P eltűnik és átalakul 138nP peptiddé) (16. ábra), így szerepet játszhat a T-sejt-aktiválás down-regulációjában.



16. ábra

MEKC kromatogramok: a CD45 defoszforilálja a TCR/CD3 komplex ζ -láncának fragmensét (138P $\rightarrow$ 138nP, zöld vonal); a 138nP és 138P peptidek együttesen analizálva (barna vonal)
MEKC körülményei azonosak a 15. ábrán bemutatottakkal.

2.3.5. Tumorellenes LH-RH-konjugátumok előállítása és vizsgálata [XV-XVIII]

A luteinizálóhormon felszabadító hormon (luteinizing hormone releasing hormone, LH-RH, más néven gonadotropin-releasing hormone, GnRH, gonadotropin felszabadító hormon) egy 10 aminosavból álló peptid (17. ábra), amely pre-pro-LH-RH formájában a hipotalamusz idegsejtjeiben (arcuat magvak) termelődik [75]. A már processzáldott LH-RH pulzáló módon a hipofízis portális keringésébe választódik ki [76], ahonnan a hipofízis elülső lebenyébe jutva a GnRH-receptorok aktiválásával beindítja a gonadotropinok (follikulus-stimuláló hormon, FSH; luteinizálóhormon, LH) szintézisét. Ez utóbbiak azután az ivarszervekre hatva növelik az androgén, ösztrogén és progeszteron termelését, szabályozzák a nemi működést.

Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-CONH₂

17. ábra

A luteinizálóhormon felszabadító hormon (LH-RH) szerkezete

Az LH-RH izolálása és szerkezetének felderítése óta (Schally és Guillemin 1977, Nobel-díj) [77, 78] több ezer szintetikus analógiát állították elő [79, 80]. Agonista és antagonistáknak az endokrinológiában és a nőgyógyászatban a fertilitás szabályozására, a korai pubertás, endometriózis stb. kezelésére használják, míg az onkológiában a hormon-szenzitív emlő és prosztata tumorok terápiájában elfogadott és széles körben alkalmazott hatóanyagok [81].

Napjaink leghatékonyabb antitumor hatású LH-RH analógiáihoz az alapmolekula szisztematikus módosításaival, D-aminosavak és különleges, nem fehérjealkotó aminosavak beépítésével jutottak el [82]. A 6. és 10. pozícióban történő helyettesítés a természetes hormonnál sokkal aktívabb és elhúzódó hatású agonistákat eredményezett, míg az 1, 2, 3, 6 és 10 pozíciókban történő változtatásokkal FSH és LH felszabadulást gátló antagonistákhoz jutottak [83, 84]. LH-RH szuperagonisták használatosak szexuálhormon és növekedési faktor-függő emlő és prosztata tumoros betegek kezelésére [85, 86]. A rákos sejtek növekedésének gátlását egyrészt az LH-RH által okozott szteroid-szint csökkenés okozza, azonban ismert ezen peptidek tumorsejtekre kifejtett direkt hatása is [87]. Ez a terápia azonban nem tudja megakadályozni az ugyanabban a tumoros szövetben esetleg jelenlévő hormon-independens sejtek növekedését. Hormon- és kemoterápia együttes alkalmazása megoldást jelenthet ezekre az esetekre. Ha egy hatékony LH-RH agonistához vagy antagonistához citotoxikus csoportot kapcsolunk, akkor egy olyan „bűvös golyó” (magic bullet) jön létre, melynek „célba találását” (a rákos sejt felszínén lévő receptorokhoz történő eljutást) maga a hormon vezérli [88]. Egy ilyen analóg egyrészt rendelkezik az agonista, illetve az antagonistáé hormonális hatásával, másrészt mint a kemoterápiás hatóanyag hordozója szerepel. LH-RH receptorok jelenléte vagy megjelenése emlő-, prosztata-, végbél-, ovárium- és agytumorokban már ismert [89, 90]. Fekete és mtsai [91] kimutattak LH-RH receptorokat hormon-independens hasnyálmirigyrákban is. (Az LH-RH analógok internalizációja leírt folyamat [92]).

A klinikailag használt rákellenes gyógyszerek közül számos alkalmasnak látszott peptidekhez való kapcsolásra. Ezek vagy már eleve tartalmazzanak olyan funkciós csoportot, melyeken keresztül a kapcsolat kiépíthető, vagy az könnyen kialakítható. Peptidek részéről azok szabad amino-, karboxil- és szulfhidrilcsoportjai használhatók fel a citotoxikus anyaghoz történő kapcsolásra. Biológiai vizsgálatok céljára olyan LH-RH származékokat

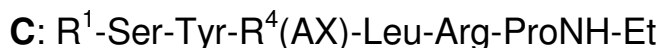
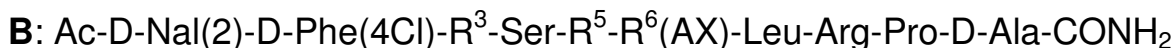
szintetizáltunk, amelyek a sejtosztódás különböző fázisaira ható citosztatikus csoportokat tartalmaznak a peptidrészhez kapcsolva.

Kísérletek

A citotoxikus csoportot hordozó LH-RH agonisták és antagonisták prekursorait szilárd fázisú peptidszintézissel, Boc-stratégiával DCC/HOBt kapcsolással állítottuk elő. A prekursorok nyerstermékének preparatív tisztítása után (21,2 x 250 mm Dynamax Macro (12 µm, C18, 300 Å oszlop, Rainin, USA), 0,1% TFA-acetonitril gradiens) a citotoxikus csoportot oldatfázisú reakcióban építettem be a molekulába, melyet ismételt HPLC-s tisztítás követett. A termékek tisztaságát 4 x 250 mm W-Porex 5C18 (Phenomenex, USA) oszlopon ellenőriztem.

Eredmények és megbeszélésük

Citotoxikus csoportokat az agonista vagy antagonistá hatású, 6 pozícióban D-Lys-nel, v. D-Orn-nel, ill. ezek diamino-karbonsavakkal (A₂pr, A₂bu) szubsztituált LH-RH származékaira építettük be, de elkészítettük annak rövidített, 6-7 aminosavat tartalmazó változatát is (18. ábra). Citotoxikus csoportként nem-specifikus alkilezőszereket (melfalán, ciklopropánkarbonsav) tartalmazó analógokat: antrakinon szerkezetű szubsztituenseket (2-hidroximetil-antrakinon, doxorubicin), ill. antimetabolitot (metotrexát) építettünk az R⁴, ill. R⁶ pozíciókba. A nitrogénmustár típusú melfalán régóta ismert a klinikumban mint tumorelleses gyógyszer [93]; a ciklopropán feszült gyűrűjéből eredő nagy reakciókészsége szintén jól ismert. A doxorubicin rákellenes antibiotikumként használatos a klinikai gyakorlatban [94], az antrakinon származékok bioreduktív alkilezőszerként ismertek, míg a metotrexát (fólsav antagonistá) az onkológiában használatos gyógyszer [95].



18. ábra

Citotoxikus csoportot tartalmazó agonista (**A**), antagonistá 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

A termékek tisztasága, köszönhetően a kétlépéses HPLC tisztításnak mindig nagyobb volt 95%-nál. Ehhez hozzájárult az is, hogy a kromatográfiás frakciók összeöntésénél a nagyobb tisztaságra, mintsem a nagyobb mennyiségre törekedtünk. A melfalánt tartalmazó peptidek gyors tisztítására a HPLC különösen alkalmas, ugyanis a melfalán vizes oldatban instabil [96], könnyen elhidrolizál. A kromatográfiás frakciók jégben gyűjtésével, majd azonnali liofilizálásával biztosítható volt a peptidek homogenitása. A metotrexát glutaminsav részének α és γ karboxilcsoportjai is reagálhatnak a peptid aminocsoportjával, ezért α és γ amid egyaránt képződött. A két termék analitikai HPLC-vel megkülönböztethető, de preparatíván elválasztani csak egy vegyület esetében sikerült. NMR vizsgálatok megállapították, hogy az először eluálódó termék a γ -szubsztituált konjugátum, ami egyébként jobban kötődik mellrák sejtmembrán receptorokhoz.

Az előállított citotoxikus csoportot tartalmazó LH-RH termékek HPLC-s retenció adatait, biológiai aktivitását, hipofízis- és mellráksejteken mért receptorkötést a Függelék 2-4. táblázatai tartalmazzák. Az agonista analógokban a D-aminosavnak köszönhető LH-RH aktivitásnövekedést a hidrofób citotoxikus csoportok beépítése tovább növelte. A legtöbb citotoxikus csoporttal monoszubsztituált agonista nagy affinitást mutatott humán emlőkarcinóma-sejtek LH-RH receptoraival szemben. Az AG-3, AG-8 és AG-9 konjugátumok SKBr-3, MDa-MB-231 és T-47D, az AG-6, AG-7, AG-8 agonisták MCF-7 emlőkarcinóma-sejtvonalakon, az AG-6, AG-9 analógok PC-3 és LNCaP prosztata sejtvonalakon mért [^3H]-timidin-beépülést gátló hatása jelzi ezen analógok tumornövekedés-gátló hatását. Az antagonisták *in vivo* ovulációgátlását tekintve (Függelék 3. táblázat) feltűnő a D-Pal(3)³ analógok nagyobb aktivitása a D-Trp³ analógokhoz képest. Az antagonistá analógok receptorkötése csökkent, de az ANT-3 és ANT-15 konjugátumunk kiemelkedően nagy citotoxikus hatást mutattak prosztata-, míg az ANT-13, ANT-15 és ANT-17 analógok többfajta emlőkarcinóma sejtvonalakon. Három analógunk (AG-6, AG-9, ANT-15) *in vivo* antitumor hatását ösztrogén-független MXT tumoros egereken vizsgáltuk. Az antrakinont tartalmazó agonista és antagonistá konjugátum jobban gátolta a tumor növekedését, mint az egyedül adott ekvimoláris mennyiségű hormon vagy citotoxikus szer. A rövidített hexa- és heptapeptid analógok agonista hatást nem, de atipikus antagonistá hatást mutattak (Függelék 5. táblázat). A hibrid molekulák kötődnek hipofízis, humán emlő és prosztata rákos sejtek receptoraihoz. MCF-7 emlőkarcinómás sejteken kis citotoxikus hatással rendelkeztek.

Felhasználva az általam előállított citotoxikus analógokat, kollégáim állatkísérletben először bizonyították be, hogy ez a típusú „magic bullet” működik, azaz a hormon célba juttatja a hozzákapcsolt tumorelles szer. Hordozóként más, a rákos sejt felszínén specifikus

receptorral rendelkező peptidet (pl. szomatosztatin, bombezin stb.) használva egyéb citotoxikus vegyület is eljuttatható a hatás színhelyére, csökkentve ezáltal az egészséges sejtek károsodását [88]. Továbbfejlesztve az eredeti elgondolásunkat, Nagy és mtsai olyan szomatosztatin-doxorubicin származékot állítottak elő, amely 500-1000-szer hatékonyabb tumorelles szer, mint a doxorubicin önmagában [97].

2.4. DISZKUSSZIÓ

A végtermékek tisztaságának, ill. szennyezésprofiljának felderítéséhez, minden komponens elválasztásához ortogonális rendszerek alkalmazása szükséges. A kereskedelemben kapható RP-oszlopok óriási választéka lehetőséget ad különböző szelektivitású oszlopok kiválasztására, amelyeken az elválasztott komponensek eltérő retenciója legfőképpen a minta-állófázis kölcsönhatások különbözőségén alapul. Egy-egy kromatográfiás rendszer (egy adott álló- és mozgófázis kombinációja) jelentősen eltérő szelektivitású, azaz ortogonális rendszer lehet. Az ilyen rendszerekben különböző elválasztásokat lehet elérni az ismeretlen összetételű minta összetevőire, ezért megvan annak a valószínűsége, hogy minden komponenst felderíthetünk. Bár az RP-HPLC rendkívül hatékony módszer, azonban a kromatogramokon lehet néhány kritikus terület, ahol nem tudunk megfelelő felbontást elérni. Az eltérő elválasztási elven alapuló kapilláris elektroforézis és RP-HPLC között potenciálisan nagy szelektivitás-különbségek vannak (ortogonális rendszerek), ezért az ismeretlen összetételű minták analízisekor különösen előnyös e két módszer együttes alkalmazása. A kapilláris elektroforézis elektrolitjához adott adalékok, pl. ionpár-képzők, ciklodextrinek, polimerek, komplex-képzők, szerves savak, felületaktív detergenssek (SDS), szerves oldószerek, ill. ezek kombinációi ortogonális CE elválasztási rendszerekhez vezetnek (pl. MEKC, nem vizes CE).

Ortogonális elválasztási rendszerek használata a szennyezések kimutatására egyre nélkülözhetetlenebb. A minták analízise néhány ilyen rendszerben nemcsak növeli az esélyét minden szennyező felderítésének, de megteremti a lehetőséget, hogy egy-egy minta analízisére a legalkalmasabb módszert válasszuk ki. A rendszerek szelektivitásbeli különbségei, különösen MS detektálással elősegítik a mintában előforduló összes szennyezés kimutatását.

Peptidek rutinszerű tisztaságvizsgálatára a fordítottfázisú HPLC mellett legalkalmasabbnak a vele (bizonyos szempontból rokon, de) ortogonális micelláris elektro-kromatográfiás elválasztási eljárást találtam. Ezért a két módszer együttes alkalmazásával szintetikus peptidekre ki is dolgoztam egy tisztaságellenőrzési protokollt, melynek segítségével nagyobb valószínűséggel ki lehetett mutatni a termék esetleges szennyezéseit [XIX].

3. TÖMEGSPEKTROMETRIA ÉS LC/MS ALKALMAZÁSA A PEPTID ÉS FEHÉRJEKUTATÁSBAN

3.1. BEVEZETÉS

3.1.1. Tömegspektrometria

A tömegspektrometria műszeres analitikai eljárás töltéssel rendelkező anyagi részecskék tömegének, helyesebben tömeg/töltés arányának (m/z) meghatározására. Felhasználható atomok, molekulák tömegének, vegyületek elemi összetételének, keverékek anyagi összetevőinek, valamint molekulák szerkezetének felderítésére. Ezeket a méréseket kis anyagmennyiségű komplex mintákból, rendkívüli érzékenységgel lehet végrehajtani, de ugyanakkor egy nagyon specifikus, pontos és reprodukálható kvantitatív módszer áll rendelkezésünkre. A tömegspektrometria ma vitathatatlanul egyike a legsokoldalúbb analitikai eljárásnak: azon túl, hogy a kémia majdnem minden ágában használatos (szervetlen-, szerves-, fizikai-, geo-, bio- és analitikai kémia), köszönhetően az utóbbi két évtizedben a műszerek és a módszerek területén bekövetkezett óriási fejlődésnek, mind a biológia, az orvostudomány és az anyagtudományok területén nélkülözhetetlen módszerré vált.

Az első tömegspektrométer megalkotója Thomson angol fizikus volt [98], akinek neve az elektron és az izotópok felfedezésével vált ismertté. Munkásságáért 1906-ban Nobel-díjat kapott. 1918-ban Dempster kifejlesztette az elektronionizációs ionforrást és az első szektoros mágneses tömegspektrométert irányfókuszálással (szög). A tömegdefektus felfedezője, Aston megalkotta az első energiafókuszálással működő mágneses készüléket (1922-ben Nobel-díj). A kereskedelmi forgalomban az 50-es években megjelenő, egyre megbízhatóbb készülékek felkeltették a szerves kémikusok figyelmét is és egyre növekvő számban kezdték alkalmazni a legkülönbözőbb szerves preparátumok analízisére. Az első közlemény aminosavak és peptidek analíziséről 1958-ban jelent meg [99]. A háttérben a fizikusok tovább dolgoztak és egymás után fejlesztették ki az újabb és újabb analizátorokat (lineáris repülési idő [100], ionciklotron rezonancia [101], kettős fókuszálás [102], a kvadrupól és ioncsapdás [103]). Az ekkor kifejlesztett ioncsapdás analizátorért Paul és Dehmelt 1989-ben fizikai Nobel-díjat kapott. Amíg az első „kapcsolt technikát” a GC-MS-t 1956-ban kidolgozták [104], addig a másik elválasztástechnikai módszernek, a folyadékkromatográfiának tömegspektrometriával való összekapcsolására 20 évet kellett várni [105]. A technika használatát azonban a tömegspektrométerbe bevezethető kicsi, alig néhány $\mu\text{l}/\text{perc}$ áramlási sebesség és a rendelkezésre álló, hőérzékeny és nagyobb molekulatömegű vegyületek analízisére alkalmatlan elektronimpakt (EI) és kémiai ionizációs (CI) technikák gátolták. A folyamatos

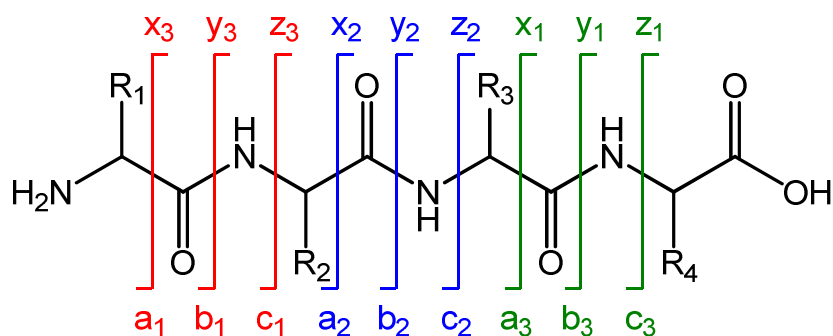
áramlású „gyors atom bombázásos” (FAB), a termospray és a „particle beam” interface-k használata segítette az LC-MS technika terjedését, azonban az igazi, robbanásszerű áttörést az atmoszférikus nyomású ionizációs módszerek, az „atmoszférikus nyomású kémiai ionizációs” (APCI) és az elektropray ionizációs ionforrások (ESI) kifejlesztése [106] hozta. A „mátrix segítette lézer deszorpciós ionizáció” (MALDI) kidolgozásával [107] elhárult az akadály a biopolimerek érzékeny vizsgálata elől. Fenn és Tanaka, a „lágý” ionizációs módszerek kifejlesztéséért 2002-ben Nobel díjat kaptak.

3.1.2. A tömegspektrometria alkalmazása peptidek, fehérjék analitikájában

A nagyobb molekulatömegű, poláris vagy hőérzékeny minták, pl. a biomolekulák, biopolimerek (peptidek, fehérjék, nukleotidok, nukleisavak stb.) tömegspektrometriás analízisére a „lágý” ionizációs technikák (ESI, MALDI) megjelenéséig nem volt lehetőség, mert nem állt rendelkezésre olyan ionizációs módszer, melynek során ezen anyagok ionizációja és gázfázisba történő bevitele bomlás nélkül végbement volna.

Biopolimerek jellemzésének első lépése a molekulatömeg meghatározása. A 70-es évek végéig erre a célra elektroforetikus, kromatográfiás és ultracentrifugálásos módszereket használtak. Az eredmények nem voltak megfelelően pontosak (átlagosan 10-100% relatív hiba), mert a meghatározások csak egy, a molekulatömeggel valamilyen kapcsolatban álló más paraméteren (konformáció, hidrodinamikai, v. Stroke-sugár), s nem annak direkt mérésén alapultak. A következő lépés a peptidek, fehérjék aminosavszekvenciájának meghatározása. Erre a célra csaknem kizárólag az Edman-lebontás alkalmazták. Az Edman-lebontás azonban csak a természetes, nem módosított aminosavakra működött jól, N-terminálison blokkolt peptidekre nem volt használható, valamint korlátozott hosszúságú N-terminális szakasz szekvenálására volt képes. A tömegspektrometria, köszönhetően a bevezetett „lágý” ionizációs technikáknak és a nagyobb molekulatömegek meghatározására is alkalmas analizátoroknak, csak az 1990-es évek elejére vált meghatározó analitikai módszerré a peptid és fehérjekémia, majd később az élettudományok területén. Túl azon, hogy a peptidek és fehérjék molekulatömege pontosan meghatározható, képes azok szekvenciájának meghatározására is, különösen ha tandem tömegspektrometriát használnak. A peptidek és fehérjék tömegspektrometriás fragmentációja tömeginformációkat ad, amit fel lehet használni a peptid/fehérje azonosítására, *de novo* szekvenálására és nem utolsósorban poszt-transzlációs és egyéb kovalens módosítások azonosítására és lokalizálására [108- 114].

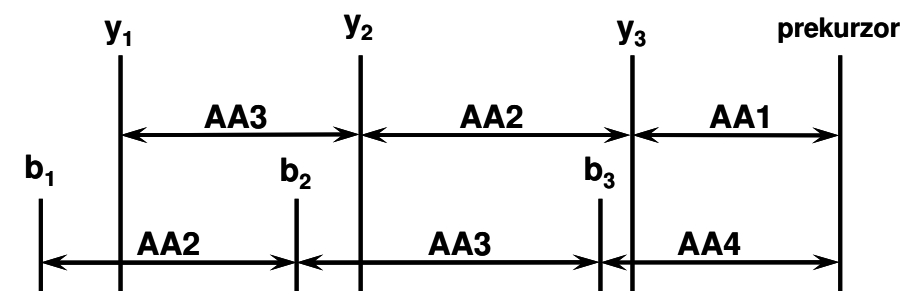
A tandem tömegspektrométer ütközési régiójában az ionok semleges gázatomokkal, pl. Ar atomokkal ütköznek. Az energiaátadással járó ütközések hatására „ütközés-indukálta disszociáció” („collision induced dissociation”, CID vagy metastabil fragmentáció (PSD)) játszódik le, melynek során a peptidlánc előre megjósolhatóan, többnyire az amid kötések mentén, a karbonil- és az aminoscsoport között hasad (fragmentálódik). Egyszeres töltésű ionoknál a disszociáció pozitív iont és semleges fragmenst eredményez, míg többszörös töltésű ionoknál mindegyik fragmentum hordozhat töltést. Ha ez a töltés az N-terminálison helyezkedik el, akkor **b**-ionokról, ha a C-terminálison, akkor **y**-ionokról beszélünk [115, 116]. Az alsó indexben lévő szám az adott láncvégtől való pozíciót jelzi. Az egymás melletti két **b**- vagy **y**-ion közötti különbség megfelel a közéjük eső aminosav-maradék tömegének. Nagyobb energiájú ütközések hatására **a** és **x**, ill. **c** és **z** ionok is létrejöhetnek (19. ábra).



19. ábra

Peptidek fragmentációjának szabályai
(a színes függőleges vonalak a kötések hasadási helyeit jelölik)

A fragmentációs szabályok ismeretében és megfelelő gyakorlat megszerzése után a peptidek MS/MS spektruma megfejthető és a peptid aminosavsorrendje (AA1-AA2-AA3-AA4) felírható (20. ábra).



20. ábra

Egy tetrapeptid elméleti MS/MS spektruma **b**-, ill. **y**-ionok sorozatával, melyből a szekvencia megfejthető

Manapság a proteomikai vizsgálatokban esetenként több ezer MS/MS felvételt kell kiértékelni, ami szoftverek alkalmazása nélkül irreális vállalkozás. Fehérjék szerkezetének megállapítására szolgáló további tömegspektrometriás módszerekről a 4.1. fejezetben lesz szó.

A teljesség igénye nélkül felsorolom a peptid és fehérjekémia azon területeit, ahol a tömegspektrometria ma már nélkülözhetetlen. (Ide írhatnám a 2.1.3. fejezetből a HPLC alkalmazásának lehetőségeit is, mert azt tömegspektrometriával kiegészítve sokkal több információt nyerhetünk a vizsgált biopolimerünkről.)

- Peptidek és fehérjék molekulatömegének meghatározása
- Izolált fehérjék (HPLC, PAGE) primer szerkezetének felderítése „peptid tömeg térképezés” és MS/MS módszerekkel
- Tisztított fehérjék mikroheterogenitásainak vizsgálata
- Rekombináns technikákkal előállított fehérjék, antitestek aminosav szekvenciájának megerősítése
- Ko- és poszt-transzlációs módosítások detektálása, azonosítása és lokalizálása
- Diszulfid hidak helyeinek feltérképezése
- Fehérjebontási termékek, metabolitok azonosítása
- Nem-kovalens kölcsönhatások vizsgálata
- fehérje-ligandum, antigén-antitest kötődések vizsgálata
- Enzimek aktív helyeinek felderítése
- Fehérje "folding", magasabb rendű struktúrák vizsgálata

3.1.3. Folyadékkromatográfia-tömegspektrometria (LC/MS)

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.

A tömegspektrometria ereje abban rejlik, hogy a legtöbb vegyület (tandem) tömegspektruma elég specifikus ahhoz, hogy abból a vegyületet nagy megbízhatósággal, esetleg minden kétséget kizáróan azonosítani lehessen. Azonban, ha a mérni kívánt vegyület valamilyen mátrixban van jelen, a belőle nyert tömegspektrum tartalmazni fogja az összes ionizált komponenst, ami – különösen, ha vegyületünk minor komponens – bizonytalanná, esetleg lehetetlenné teszi azonosítását. A kromatográfia elválasztóképességének és a

tömegspektrometria tömegmérési képességének kombinálásával létrejött új analitikai módszer, az LC-MS nagyszerűsége abban van, hogy a hasonló vagy azonos retenció tulajdonságokkal rendelkező mintakomponenseket különböző tömegspektrumuk alapján differenciálni tudja. Túl a minőségi információn, LC-MS-sel olyan mennyiségi meghatározásokat is el lehet végezni, mely csak LC alkalmazásával (a nem tökéletes elválasztás miatt) nem lett volna kivitelezhető.

A két módszer összekapcsolására különféle próbálkozások voltak, hogy a fő inkompatibilitási problémákat legyőzzék [117]. Az elektropray ionforrást eredetileg kis áramlási sebességű belépő folyadékokra tervezték. Ahhoz, hogy a HPLC-ben általánosan használt 1 ml/perc áramlási sebességű elválasztást tömegspektrométerrel detektálni lehessen, az elútumot 1/100-1/1000 arányba leosztották, s a kisebb hányadát vezették be a tömegspektrométerbe. A nagyobb, 10-1000 µl/perc sebességek használatához pneumatikus rásegítésre van szükség, amit leggyakrabban nitrogéngáz bevezetésével oldanak meg. Az tapasztalták [118], hogy bár a tömegspektrométer tömeg-áram típusú detektor, a folyadékáram csökkenésével (nanoESI, microESI) mégis nő a detektor érzékenysége. Ennek oka, hogy alacsonyabb áramlási sebesség mellett megnő az ionizáció és az ionmintavételezés hatékonysága [119]. Néhány 10 nl/perc áramlásnál nanoESI illesztőegység használatával már 15 évvel ezelőtt attomol detektálási szintet értek el [120]. A nanoESI és mikroESI kifejlesztésével és tömegspektrométerek képességeinek, műszaki színvonalának előrehaladtával rendelkezésre állt egy rendkívül érzékeny, kis mennyiségű minták analizálására szolgáló készülék. Azonban ezt a képességét csak akkor lehetett komplexebb összetételű mintákhoz kihasználni, ha hasonló dimenzióban működő elválasztástechnikai rendszert, nanoLC-t, kapilláris LC-t vagy kapilláris elektroforetikus készüléket kapcsolnak hozzá.

A nano- és kapilláris kromatográfia a konvencionális HPLC-hez viszonyítva nagyobb felbontású, nagyságrendekkel érzékenyebb elválasztástechnikai módszer rendkívül kis mennyiségű minták elválasztására. Ugyanakkor jelentős oldószermegtakarítással jár, ami csökkenti a környezetterhelést. (Meg kell jegyezni, hogy mindezek az előnyök csak akkor érvényesülnek, ha a kromatográfiás rendszer kimondottan nano- mikroHPLC célra készült megfelelően kicsi holttérfogatokkal. Ugyanakkor az is igaz, hogy az oszloptöltési technológia nagyon befolyásolja az oszlop minőségét, és emiatt a kapilláris méret előnyei nem mindig nyilvánulnak meg.)

3.2. CÉLKITŰZÉSEK

- A., Analitikai mérések kivitelezéséhez szükség van a megfelelő eszközökre, módszerekre és ismerni kell azok alkalmazási határait. Ha nincs vagy nem elérhető az eszköz, akkor el kell készíteni. Nagy érzékenységű MS, LC-MS és LC-MS/MS mérések bevezetéséhez szükségünk volt kapilláris kromatográfiás oszlopra, statikus és dinamikus nanoESI ionforrásra, valamint CE-MS, CE-MS/MS összekapcsoló (interface) egységre. Egyik sem állt rendelkezésre, ezért terveztük ezek elkészítését, ill. összeállítását.
- Nem volt ismert, ezért meg akartuk vizsgálni, hogy peptidek LC-MS mérésére melyik ionizációs mód, az ESI vagy az APCI az érzékenyebb és alkalmasabb. Gyógyszerkutatás korai fázisához kerestünk olyan módszert, ami gyorsan és lehetőleg specifikusan kiszűri azokat a vegyületeket, melyek nem felelnek meg a gyógyszerre válás követelményeinek. Elhatároztuk, hogy kidolgozzuk az „immobilizált mesterséges membrán”-kromatográfia online tömegspektrometriás detektálását.
- B., Meg kívántuk vizsgálni, hogy a gyógyszerkutatás korai fázisában milyen módon lehet a tömegspektrometriát, ill. LC-MS-t használni a kombinatorikus könyvtárak összetételének meghatározására, egy potenciális jelölt farmakokinetikai paramétereinek analízisére és a vér-agy gáton történő átjutásának meghatározására.
- C., Az oxitocin és a vazopresszin a hipofízis hátsó lebenyének hormonjai. Egyre több jel mutatott arra, hogy ezek a peptidek nem csak a hipotalamuszban képződnek. Meg akartuk tudni, hogy vajon maga a hipofízis termeli-e azokat és hogy külső hatás befolyásolja-e a hormon szintézisét?
- D., Egy fehérje szerkezetének és funkciójának vizsgálata a fehérjekémiai kutatásokhoz tartozik, míg ugyanez, de nagy sorozatban, globálisan már a proteomika területe. A módszerek között nagy az átfedés, ezért két izolált fehérjének, a lucerna ciklin-függő kinázának és a *Streptomyces griseus* „faktor C”-jének tömegspektrometriás azonosítását itt mutatom be.
- E., A Hepatitis B vírusfertőzés komoly rizikófaktor. Diagnosztikai kit kidolgozásához kollégáim rekombináns módszerrel előállították az X-proteint, ill. az ellene specifikus monoklonális antitestet. A fehérje karakterizálásához meg akartuk ismerni szerkezetét, a diszulfid-hídjainak elrendeződését. A monoklonális antitestek specificitásának meghatározásához epitóp-térképezést akartunk végezni.

3.3. ELŐTANULMÁNYOK LC/MS KÍSÉRLETEKHEZ

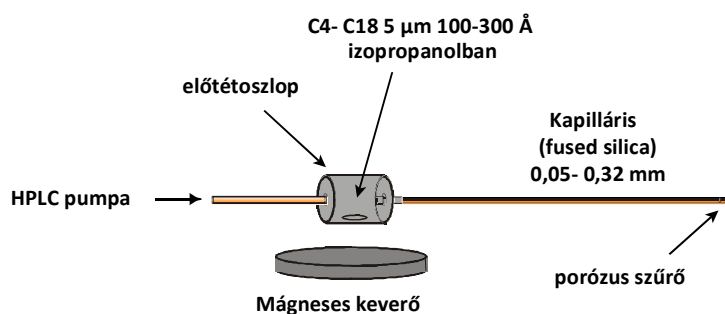
3.3.1. Nagyérzékenységű LC-MS feltételeinek megteremtése

2.3.1.1. Kapilláris kromatográfiás oszlopok készítése [XIX]

Nano- és kapilláris kromatográfiás oszlopok csak az utóbbi 10-12 évben érhetők el kereskedelemben. Korábban, ha nagy érzékenységű nano-, v. kapilláris LC-MS mérést akart valaki végezni, magának kellett az oszlopokat elkészíteni. A nanoLC oszlopokat csaknem kizárólag ömlesztett kvarc kapillárisba (25-100 μm), míg kapilláris LC-hez ömlesztett kvarc (150-320 μm) kapillárisba vagy rozsdamentes acélsőbe (300-500 μm) töltik a kromatográfiás állófázist. A töltésként 1,7-5 μm szemcseméretű, fordított fázisú szilikagél alapú állófázist [121], vagy a kapillárisban *in situ* polimerizált monolitot használnak [122]. Bár monolit oszlopot egyszerűbb készíteni, a mikrorészecskékkel töltött oszlopok népszerűbbek, mert többféle tulajdonságú állófázis kapható. A legnagyobb problémát a töltet oszlopban tartása jelenti, melyre leggyakoribb megoldás a kapilláris végébe egy vékony porózus réteg (frit) szinterezése vagy polimerizálása [123].

Kísérletek

25 cm-es, 320 μm belső átmérőjű ömlesztett kvarc kapilláris végébe nátriumszilikát-dimetilformamid-víz elegyből 100 °C-on porózus szűrőt (frit) polimerizáltunk. Nucleosil 5C18 (300 Å) HPLC töltetet izopropanolban szuszpendálva híg zagyot készítettünk, amelyet egy régi HPLC előtétoszlopba töltöttünk. Ennek egyik végébe a kapillárist erősítettük, másik végét HPLC pumpához csatlakoztattuk (21. ábra). Töltet állandó kevertetése mellett addig nyomattunk át (50-200 bar) a kapillárison izopropanolt, amíg a kapilláris a kívánt hosszra meg nem telt a töltet szemcséivel.



21. ábra
Kapilláris kromatográfiás oszlop készítése

2.3.1.2. Nano- és kapilláris LC-MS ionforrás kialakítása [XX]

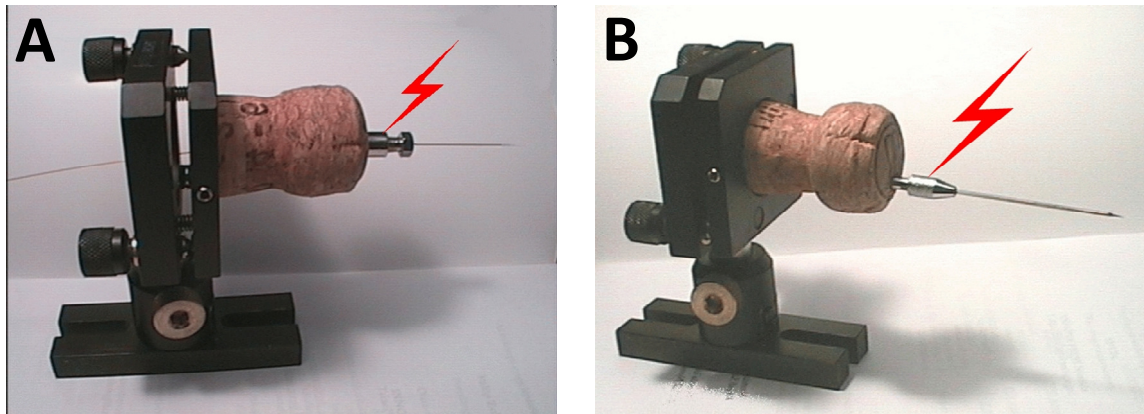
Az 1994-ben megvásárolt Finnigan TSQ-7000 tömegspektrométerünk folyadékkromatográfiás használatához csak egyfajta, standard elektropray ionforrás volt kapható, melyet 100-1000 µl/perc folyadékáramra terveztek. A folyadékáram µl/perc, de még inkább nl/perc tartományba csökkenésével egyre könnyebb lesz a cseppek képződése, egyre kisebb cseppek jönnek létre és már a kapillárisra adott feszültség is elegendő az aerosol képződéséhez [124]. A nagyfeszültséget rendszerint a HPLC kapilláris és a nano/mikro ESI kapilláris összekötésére szolgáló fém csatlakozó egységre kapcsolják. Az ilyen típusú nano-, v. mikroESI ionforrásokban a folyadékáramot külső HPLC pumpa segítségével tartjuk fenn (dinamikus ESI forrás) (22. ábra A). Azonban, ha a nanoESI kapilláris kilépő nyílását 1-2 µm-re csökkentjük, már külső nyomásra sincs szükség, a folyadékáramlást (<25 nl/perc) már a fémmel bevont kapillárisra kapcsolt nagyfeszültség is elindítja [125]. Ezt az ionforrást statikus nanoESI forrásnak nevezik, és ha nem is kromatográfiával kapcsolva, de kiválóan használható rendkívül kis mennyiségű peptidek, fehérjék analízisére [126].

Kísérletek

Kutatócsoportommal a nano- és kapilláris LC tömegspektrométerhez kapcsolásához egy egyszerű konstrukciójú interface-t alakítottunk ki (24/A. ábra). 100 µm belső átmérőjű ömlesztett kvarc kapillárist magas hőmérsékletű gázlángon kihúztuk, majd a legvégét óvatosan letörtük (a nyílás átmérője 5-15 µm). Az így elkészült nanoESI kapillárist egy zéró holtterfogatú fém csatlakozón (ZDV) keresztül kapcsoltuk a kromatográfiás kapilláris oszlophoz. Az 1-2000 V elleni védelemül a ZDV egységet parafa pezsgősdugó furatába toltuk, majd az interface-t egy 3 dimenzióban mozgatható egységbe fogtuk. Ezzel a megoldással a nanoESI tű végét pontosan tudtuk az MS belépő nyílása elé pozicionálni. A statikus nanoESI ionforrás (22/B. ábra) kialakításához hasonló befogóegységet használtunk, azonban a nanoESI tűt boroszilikát kapillárisból (0,7 mm belső átmérő) precíziós kapillárishúzó készüléken készítettük, majd a nanoESI tű külső felületére „sputter coating” technikával [127] vékony aranyréteget gőzölögtettünk.

Eredmények és megbeszélésük

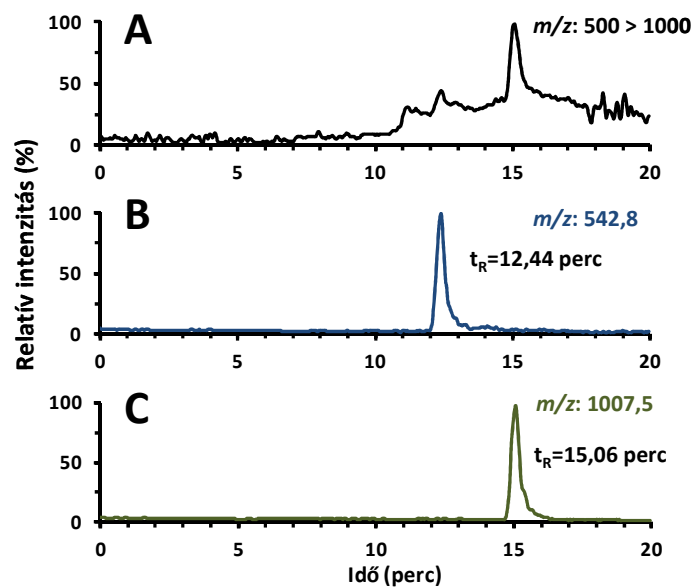
A bemutatott kapilláris HPLC oszlopkészítési módszerrel az évek alatt sok oszlopot állítottam elő 75-320 µm belső átmérőjű kvarc kapillárisok és 3-5 µm szemcseméretű, különböző fordítottfázisú (C4, C8, C18) töltetek felhasználásával. A kapilláris oszlopokat



22. ábra

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

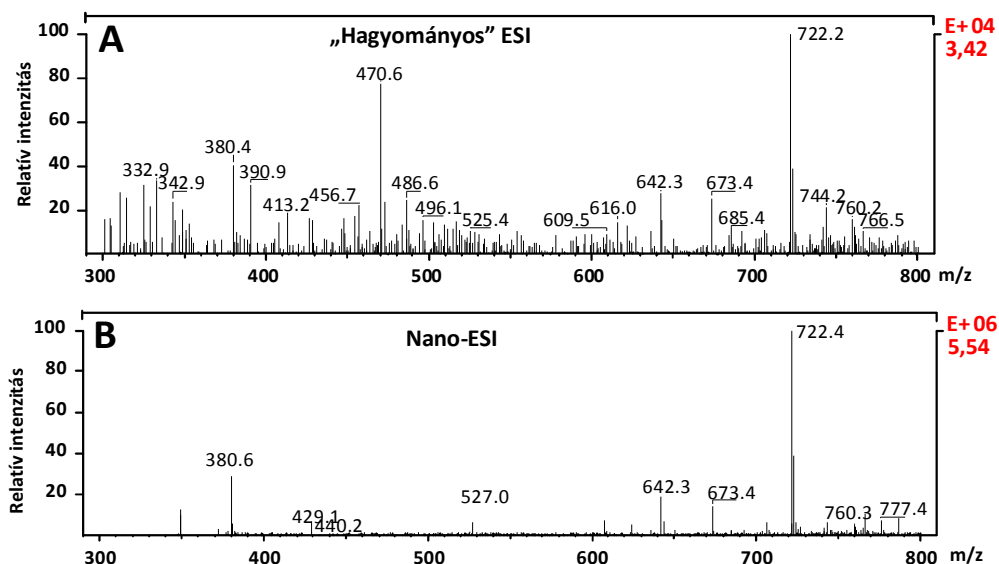
egyszerű és bonyolult peptid- és fehérjekeverékek elválasztására használtam fel. A következő fejezetekben mindig jelzem, ha egy kromatogram ilyen „saját” készítésű oszlopon készül. A 23. ábra egy ilyen kapilláris HPLC oszlopon végrehajtott, szintetikus oxitocinból és vazopresszinből álló keverék LC-MS analízisét mutatja.



23. ábra

Oxitocin és vazopresszin kapilláris LC/MS analízise
 totál-ion kromatogram (A), a vazopresszin $[M+2H]^{2+}$ extrahált-ion kromatogramja (m/z 542,8) (B), az oxitocin $[M+H]^+$ extrahált-ion kromatogramja (m/z 1007,5) (C)
 HPLC: 320 μm x 150 mm Nucleosil 5C18 100Å oszlop, A eluens: 0,2% ecetsav, B eluens 0,2% ecetsav-80% acetonitril, gradiens: 5-95% B/20 perc, áramlási sebesség 150 μl /perc, leosztás ~1:100
 MS: mikroelektrospray feszültség: 2 kV, kapilláris hőmérséklet: 250 °C

Statikus nanoESI ionforrást alkalmazva drámaian (mintegy 100-szorosan) megnőtt a detektálás érzékenysége és 1 µl-nyi mintából 35-45 percig tudtam MS és MS/MS spektrumokat készíteni (24. ábra).



24. ábra

Szilárdfázisú peptidszintézissel előállított tisztítatlan hexapeptid MS spektruma a TSQ-7000 tömegspektrométerhez szállított normál (A), ill. saját készítésű statikus nanoESI ionforrás (B) alkalmazásával, MS: 1400 V

3.3.2. Atmoszférikus nyomású ionizációs módszerek összehasonlítása [XXI]

Az atmoszférikus nyomású ionizációs módszerek (ESI és APCI) kifejlesztése tette lehetővé a folyadékkromatográfiás/elektroforetikus elválasztások on-line tömegspektrometriás detektálásának széleskörű elterjedését. Nem találtunk tematikus publikációt, amely eligazított volna, hogy melyik ionizációs módszer megfelelőbb peptidek nagyobb érzékenységu analízisére.

Kísérletek

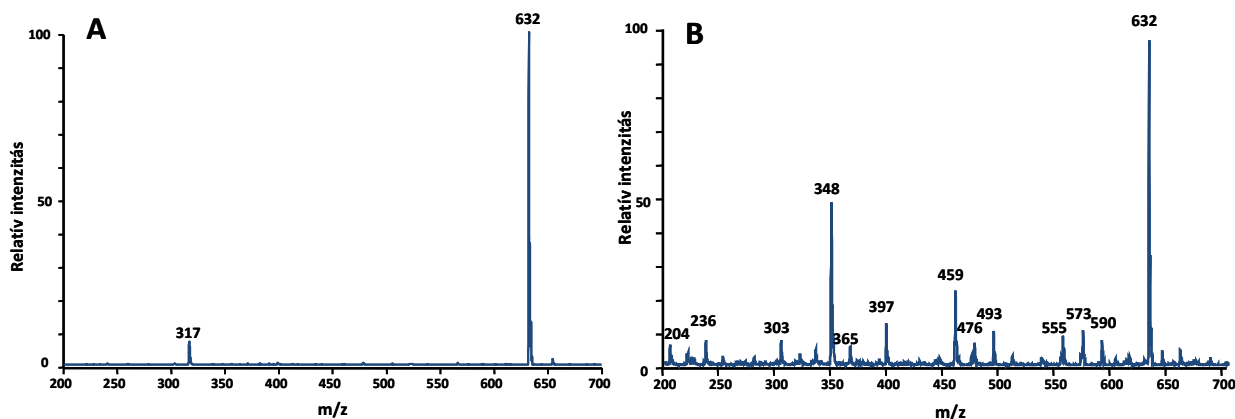
Danzil-Pro-Gln-Arg-NH₂, egy potenciálisan neuropeptid FF antagonista hatású peptidet vizsgáltuk mind a két atmoszférikus nyomású ionizációs módszerrel. A peptid vizes oldatából 10 µl-t jutattatunk be a 250 µl/perc áramlási sebességű folyadékaramba (0,1% ecetsav-50% metanol), majd ESI vagy APCI ionforrást alkalmazva LCQ kvadrupól ioncsapdás tömegspektrométeren (Thermo-Finnigan) MS (MS/MS) spektrumot készítettünk. A módszerek érzékenységének összehasonlításához még egy „kis sebességű” (10 µl/perc) ESI

vizsgálatot is végeztünk, amelyben az elhúzó csúcsok kiküszöbölésére a peptidet 300 μm x 20 mm TARGA C18 oszlopon (Higgins Analytical, USA) csapdáztuk.

Eredmények és megbeszélésük

Az APCI egy igen stabil, megbízható és sokszor a legjobb módszer gyógyszerek, gyógyszer-metabolitok LC-MS analízisére [128]. Az APCI ionforrás használata minimális hangolást és optimalizálást igényel és gyakran kevésbé érzékeny a mátrixhatásra, mint az ESI [129]. Néhány összehasonlító tanulmány azt mutatta, hogy – az analizálandó vegyület típusától függően – az ESI gyakran előnyösebb. Enzim-inhibitorokat, ill. metabolitjaikat vizsgálva azt találták [130], hogy az APCI rendkívül érzékenyen működött hidrofób anyagokra, de alkalmatlan volt a hidrofil vegyületek megfelelő detektálására, addig az ESI 10-100x érzékenységgel mutatta ki pl. a glutation konjugátumokat. Az ESI érzékenyebbnek mutatkozott N-acetil-ciszteinil-lizin dimerek kimutatásánál is [131]. Gyógyszerfejlesztési kutatásunk során danzilezett (nagy hidrofób csoport) peptidokkal kívántunk foglalkozni, de a danzilezés lerontotta az ESI hatásfokát gyógyszermetabolitok vizsgálatánál [132]. Mindkét technika egyformán teljesített közepesen poláris vegyületek esetén [133].

Mind a két tömegspektrometriás ionizációs módszer értékelhető spektrumot adott a danzil-Pro-Gln-Arg-NH₂ peptidről, melyekben a protonált molekulaion (m/z 632) volt a báziscsúcs (25. ábra).



25. ábra

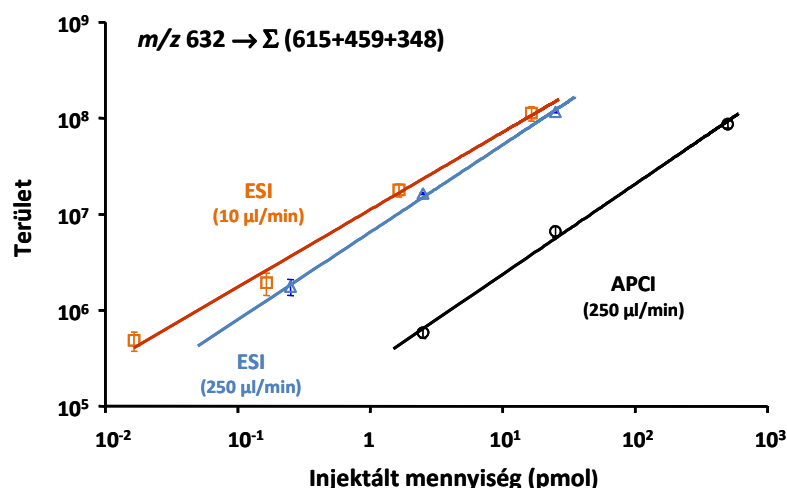
A danzil-Pro-Gln-Arg-NH₂ (m/z 632) ESI-MS (A) és APCI-MS (B) spektrumai
ESI: 4200V, kap. hőmérséklet: 220 °C, öblítőgáz: nitrogén 80 l/h, segédgáz: 20 l/h

APCI: koronakisülési tű: 5 μA , 450 °C, kap. hőmérséklet 150 °C, öblítőgáz: nitrogén 40 l/h, segédgáz: 10 l/h

Az APCI spektrumon azonban számos molekulatöredék (fragmens ion) látható, de a legintenzívebb fragmens ion relatív intenzitása sem érte el a molekulaion intenzitásának 50%-át. A spektrumokból kitűnik, hogy az APCI nem annyira „lágy” ionizációs módszer, ami

valószínűleg a magas hőmérsékleten (450 °C) végbement gázfázisú ionizációnak köszönhető. (Az elektropray ionforrásban az ionizáció oldatfázisban történik).

Az kvadrupól ioncsapdás tömegspektrométerek elsősorban nem kvantitatív analízisre készültek. Ötletet merítve azonban Tiller és mtsai munkájából [134], LC-MS/MS módszert állítottunk be a danzil-Pro-Gln-Arg-NH₂ peptid kvantitatív meghatározására. Kalibrációs görbe készítésekor a protonált molekulaionból (anyaion) képződő három legintenzívebb leányion (m/z 348, 459, 615) (26. ábra) intenzitásának összegét ábrázoltuk a koncentráció függvényében. Az eredményekből látható, hogy az adott peptidszármazéokra hasonló áramlási sebesség mellett az ESI ionizáció 50-100x érzékenyebb, mint az APCI. A „kis sebességű” ESI kísérletben még további 5x érzékenységnövekedést értünk el, azonban kisebb volt a módszer stabilitása, (sem a HPLC rendszert, sem az ESI ionforrást nem erre tervezték).



26. ábra

A danzil-Pro-Gln-Arg-NH₂ APCI- és ESI-MS módszerrel készült kalibrációs görbéi

APCI: koronakisülési tű: 5 µA, 450 °C, kap. hőmérséklet 150 °C, öblítógáz: nitrogén 40 l/h, segédgáz: 10 l/h

ESI-1: 10 µL, 4250 V, kap. hőmérséklet 200 °C, öblítógáz: nitrogén 30 l/h

ESI: 250µL, 4200V, kap. hőmérséklet: 220 °C, öblítógáz: nitrogén 80 l/h, segédgáz: 20 l/h

3.3.3. IAMC-MS rendszer kidolgozása [XXII]

A gyógyszerkutatás és fejlesztés felgyorsításhoz, hatékonyabbá és gazdaságosabbá tételéhez olyan egyszerű és nagy áteresztőképességű vizsgálatokra van szükség már a korai kutatás fázisában, melyek ki tudják szelektálni azokat a vegyületeket, melyekből bizonyosan nem lesz gyógyszerjelölt. Egy ilyen módszer a vegyületek membránokkal való kölcsönhatásainak, membránokon keresztül történő transzportjának vizsgálata, ugyanis ez a gyógyszerek farmakokinetikai tulajdonságait alapvetően befolyásolja. Számos *in vitro*

rendszer (pl. Caco-2 sejtek) létezik a membránon keresztüli transzport vizsgálatára modellezésére, azonban ezek körülményes és drága módszerek.

Lipinski és mtsai szabályokban lefektették [135], hogy egy vegyületnek milyen fizikai-kémiai paraméterekkel kell rendelkezzen, hogy egyáltalán gyógyszerjelöltségről beszélni lehessen. Ezek közül egy paraméter a molekula lipofilitása, amely elsődlegesen az adott komponens és a biológiai membrán közötti hidrofób kölcsönhatás erősségét karakterizálja. A lipofilitás jellemzése történhet pl. a vegyület *n*-oktanol-víz közötti megoszlási hányadosának meghatározásával [136], vagy fordított fázisú kromatográfiával a vegyület hidrofóbicitásának jellemzésével [137]. Ezek a módszerek azonban ionos vegyületekre nem alkalmasak, és nem ideálisak biológiai membránokkal való kölcsönhatás modellezésére. A foszfolipidekből (pl. foszfatidilkolin) kialakított liposzóma és víz közötti megoszlás vizsgálata szintén közelebb visz az igazi membránkölcsönhatások meghatározásához [138]. A membránok áteresztőképessége korrelációba hozható a molekulák foszfolipofilitásával, amit foszfatidilkolinnal módosított felületű HPLC tölteten végzett kromatográfiával (IAMC, „immobilized artificial membrane chromatography”, „rögzített mesterséges membrán” kromatográfia) lehet meghatározni [139]. Ebben a rendszerben nemcsak hidrofób, de hidrogénhidas és elektrosztatikus kölcsönhatás is kialakulhat a minta és a membránt utánzó oszlop között [140]. Az IAM oszlopon mért retenció (k'_{IAM}) arányos a membránkölcsönhatás és membránon áteresztőképességével ($k'_{IAM} = (t_{Rx} - t_{R0})/t_{R0}$). Ilyen oszlopon kapott eredmények jól korrelálnak a Caco-2 sejteken, ill. a liposzóma-víz megoszlási rendszeren kapott eredményekkel [140]. Az IAM-kromatográfia leggyakrabban UV detektorral használták, azonban, hogy egyszerre több gyógyszerjelöltet lehessen analizálni, bevezettük a tömegspektrometriás detektálást.

Kísérletek

Neuropeptid FF antagonistá hatású danzilezett peptidek foszfolipofilitását IAM.PC.DD oszlopon (Regis Tech., US) végzett kromatográfiával határoztuk meg. A gyártó által javasolt, biológiai rendszerekben gyakran használt Dubbelco foszfát puffert (DPBS, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 5,4) 5% acetonitrillel eluensként használva (UV detektálás) külön-külön megmértük az egyes peptidek visszatartását. A hét peptidet együtt kromatografálva APCI MS detektálást (eluens 10 mM ammónium-acetát puffer (pH 5,4)), ill. ESI-MS mérést (eluens 10 mM ammónium-acetát–5% acetonitril) alkalmazva is kiszámoltuk a k'_{IAM} értékeket (t_{R0} értékét citromsavval határoztuk meg.).

Eredmények és megbeszélésük

Eredetileg azért kezdtük el az IAM kromatográfia alkalmazását, hogy nagy áteresztőképességű szűrőmodszert találjunk a kombinatorikus kémiai reakciókkal előállított nagyszámú vegyület vizsgálatára. Az „egy vegyület – egy kromatogram” megközelítés azonban nem megoldás, ezért választottuk a tömegspektrometriás detektálást, amely alkalmas a keverék egyes komponenseinek azonosítására. Az eredeti módszertani leírást alkalmazva (UV detektálás) az egyes peptidek k'_{IAM} értékei széles tartományban, 1,77-7,96 között változtak (1. Táblázat). (A tisztán vizes oldatban túl nagy volt a peptidek visszatartása, ezért 5% acetonitrilt adtunk a pufferhez.)

1. Táblázat

A danzil-X-Y-Arg-NH₂ peptidek IAMC vizsgálata UV, APCI- és ESI MS detektálással
 k'_{IAM} értékek

Vegyület	DPBS, pH 5,4 5% acetonitril (UV 254 nm)	10 mM NH ₄ -acetát pH 5,4 (APCI)	10 mM NH ₄ -acetát pH 5,4, 5% aceto- nitril (ESI)
Danzil-Pro-Gln-Arg-NH ₂	5,88	6,94	4,27
Danzil-Gln-Gln-Arg-NH ₂	1,81	2,10	1,81
Danzil-Gln-Ser-Arg-NH ₂	2,73	2,98	2,33
Danzil-Gly-Gln-Arg-NH ₂	4,96	5,79	3,54
Danzil-Gly-Ser-Arg-NH ₂	7,96	8,40	4,83
Danzil-Lys-Gln-Arg-NH ₂	1,77	1,35	1,42
Danzil-Lys-Ser-Arg-NH ₂	2,69	2,27	1,62
Korreláció (r^2)		0,984	0,957

Az eddig használt Dubbelco puffer azonban nagy sókoncentrációja miatt HPLC eluensként nem alkalmazható tömegspektrometriás mérésekhez, ezért más, illékony pufferrel, 10 mM ammónium-acetáttal próbálkoztunk. Az APCI detektálással kapott k'_{IAM} értékek jól korreláltak ($r^2 = 0,984$) az előző eredményekkel. A tisztán vizes oldatok felületi feszültsége azonban nem elegendő ESI ionforrásban történő ionizációhoz, ezért az ESI detektálásokhoz 5% acetonitrilt adtunk az ammónium-acetát pufferhez. A peptidek kisebb retenciót mutattak, mint a Dubbelco pufferben, de a korreláció szintén megfelelő volt a két módszer között ($r^2 = 0,957$).

Eredményeinkből megállapítható, hogy az IAM-kromatográfia Dubbelco pufferrendszere lecserélhető illékony pufferre, így az lehetőséget ad több vegyület egyidejű analízisére tömegspektrometriás detektálást alkalmazva.

3.4. VIZSGÁLATOK LC/MS-SEL

3.4.1. A tömegspektrometria szerepe a gyógyszerkutatás folyamatának korai fázisában [XXI-XXIII]

A kombinatorikus kémia és a nagy áteresztőképességű szűrőmódszerek (“high-throughput screening”, HTS) bevezetése alapjaiban változtatta meg a gyógyszerkutatást és fejlesztést. Az új módszerekkel előállított új vegyületek, s a róluk összegyűjtött adatok óriási mennyisége fokozottan igényelte az új molekulák abszorpció, szervezeten belüli megoszlási, metabolizációs és kiürülési tulajdonságainak (“absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME”) a gyógyszerkutatás minél korábbi fázisában történő becslését és értékelését. Még nehezebb, komplexebb a feladat, ha a terápiás célpont a központi idegrendszeren belül helyezkedik el. Egy új terápiás szernek nemcsak, hogy optimális farmakokinetikai paraméterekkel kell rendelkeznie, de bizonyítani kell, hogy megfelelő dózisban eljut a kiszemelt célponthoz. A vér-agy gát (“blood-brain barrier”, BBB) csaknem teljesen megakadályozza a nagymolekulájú vegyületek és a kismolekulájú gyógyszerek 98%-ának bejutását a központi idegrendszerbe [141]. Számos *in vitro* módszert használnak a vér-agy gáton történő transzport becslésére, azonban ezek az eljárások munkaigényesek, sejttenyésztő laboratóriumot kívánnak, ill. nem alkalmasak nagy sorozatba végzett szűrővizsgálatokhoz [142]. A passzív membrántranszporttal történő abszorpció vizsgálatára a mesterséges membránok kiváló lehetőséget nyújtanak [143], azonban csak támpontokat adnak az anyag központi idegrendszerben történő biohasznosulására. Ahhoz, hogy valóban megbízhatóan felderítsük az új vegyület agyba történő bejutását, meg kell határozni koncentrációját mind a vérben, mind az agyban. A gyógyszerjelöltek plazmakoncentráció-mérésen alapuló farmakokinetikai szűrése már része a korai fázisú gyógyszerkutatásnak [144], azonban a terápiás célpont környezetében történő meghatározását és a koncentráció időfüggésének vizsgálatát – noha relevánsabb, mint a plazmakoncentráció mérése – nagyon ritkán végzik el.

Az agyi koncentrációk meghatározása rendszerint a szer intravénás adását követően az kísérleti állat (egér, patkány) lefejezésével, az agy eltávolításával, majd az agyszövetben megfelelő módszerrel történő mérésen alapszik. Ez az eljárás – amit ugyan kombinálnak a szer plazmakoncentrációjának meghatározásával – egy-egy vizsgálathoz egyrészt sok állatot kíván (időpontonként legalább 6), másrészt a szövetmintákból történő extrakció és koncentrációmérés is időigényes feladat [145].

A gyógyszerjelölt metabolizmusának korai, ha nem is teljes megismerése fontos lehet további sorsának alakulásában. Metabolikusan “stabil” vegyületek kiszűrésére legelterjedtebb módszer a hepatocita sejtekkel, máj mikroszomával, ill. enzimekkel történő *in vitro* inkubálás, majd a lehetséges metabolitok kimutatása, mérése [146].

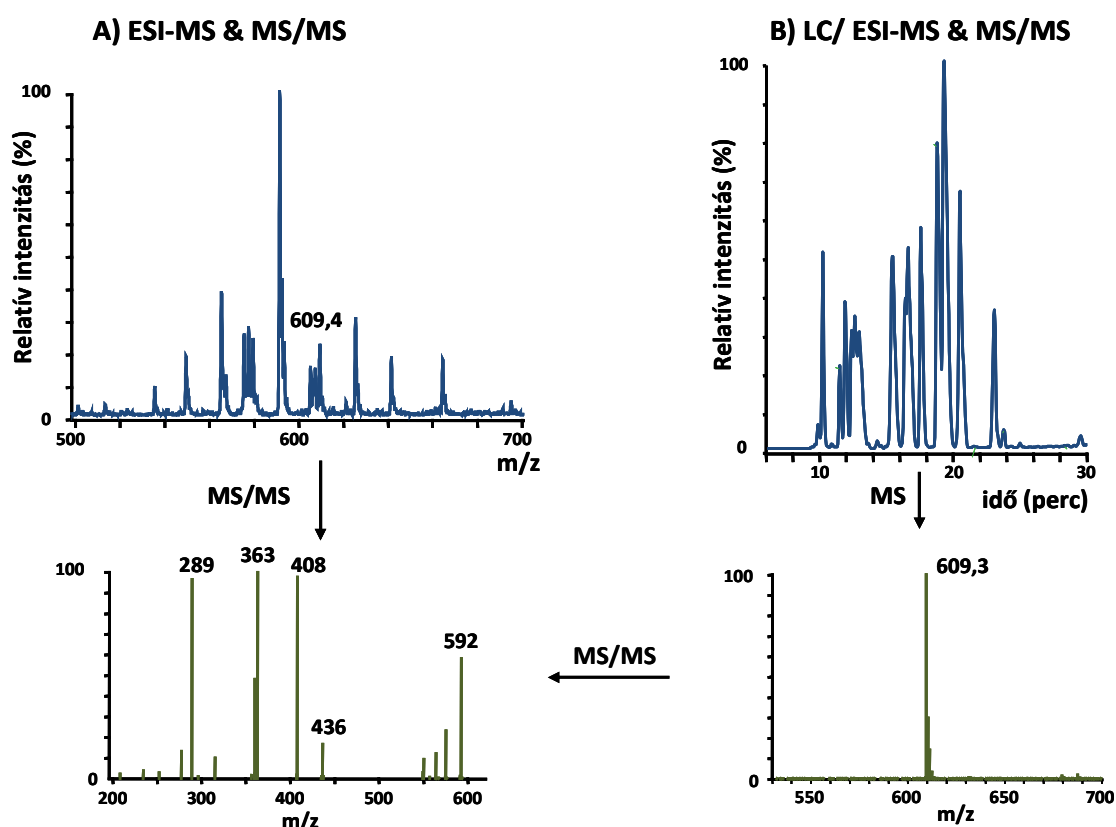
A tömegspektrometriának a gyógyszerkutatás és fejlesztés korai fázisában történő alkalmazása az elmúlt évszázad utolsó évtizedében még elég esetleges volt. Neuropeptid FF antagonistá hatású tripeptidek [147] példáján keresztül bemutatom, hogyan használtuk ki az atmoszférikus nyomású ionforrással (ESI, APCI) felszerelt tömegspektrometria nyújtotta lehetőségeket idegrendszeri célpontú gyógyszerjelöltek kutatásában. A neuropeptid FF (NPFF, FLFQPQF-amid) az agyban található antiopioid peptid, melyet kapcsolatba hoztak a morfin tolerancia és függőség kialakulásával. A neuropeptid FF antagonistái potenciális terápiás szerek az opioid-megvonási tünetek hatékony kezelésére [148].

Kísérletek

Danzil-Ala-X-Arg-NH₂ és danzil-X₁-X₂-Arg-NH₂ (ahol X, X₁, X₂ a 19 kódolt aminosav Cys nélkül) kombinatorikus könyvtár az ismert megosztás-keverés (split-mix) módszerrel készült szilárdfázisú peptidszintézissel [147]. A kísérletekhez szükséges nagyobb mennyiségű többi peptidet (néhány 10 mg) Rink-amid-MBHA gyantán állították elő. A kombinatorikus könyvtár összetételét ESI ionforrással felszerelt kvadrupól ioncsapdás tömegspektrométerrel (LCQ, ThermoFinnigan) határoztuk meg egyrészt az oldat direkt infúziójával, másrészt a minta mikroHPLC-s (Eldex Laboratories, USA) elválasztása után. A nagyfelbontású MS spektrumok Bruker gyártmányú (Bruker Daltonics Inc., USA) Apex II Fourier transzformációs ion ciklotron rezonancia (FT-ICR) tömegspektrométeren készültek. A NPFF antagonisták vér-agy gáton történő transzportját IAM-kromatográfiával és tömegspektrometriás detektálással modelleztük (lásd 3.3.3. fejezet). A danzil-Pro-Gln-Arg-NH₂ szervezetben történő megoszlását Sprague-Dawley patkányokban vizsgáltuk (“multi-rat study”). Az anyag (4 mg/kg) i.v. beadását követő 5, 15, 30 és 60 perc múlva az állatokat leöltük, összegyűjtöttük a vért és kivettük az agyat. A belső standard (danzil-Pip-Gln-Arg-amid) hozzáadása után a vérplazmából és az agy-homogenizátumból a fehérjéket kicsaptuk és a peptidek koncentrációit LC-MS módszerrel kvantitatívan meghatároztuk. Azt, hogy a szer valóban átjut-e a vér-agy gáton és onnan milyen sebességgel távozik, az előbbi módszernél jóval pontosabban és gazdaságosabban, szabadon mozgó állaton végzett agyi mikrodialízist követő kapilláris LC-MS-sel is meghatároztuk.

Eredmények és megbeszélésük

A danzil-Ala-X-Arg-NH₂ kombinatorikus könyvtár előállításakor elméletileg 19 peptid képződik ekvimoláris mennyiségben. Ennyi komponens detektálása egy kis (egységnyi) felbontású tömegspektrométernek [149], mint a kvadrupól ioncsapdás készüléknek sem okozhat problémát (27. ábra).



27. ábra

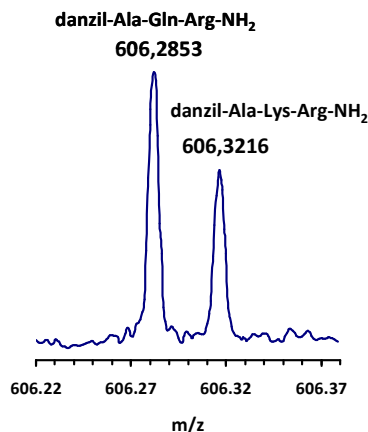
A danzil-Ala-X-Arg-NH₂ peptidkönyvtár MS és MS/MS (A), LC-MS és LC-MS/MS (B) spektruma
ESI ionforrás, 4250 V, kapilláris hőmérséklet 200 °C, MS: 2 x 200 ms, AGC 1 x 10⁸, MS/MS 2 x 200 ms, AGC 1 x 10⁷, prekursor kiválasztás 1,0 Da, 1,75 V

HPLC: 0,5 x 50 mm TARGA C18 oszlop, eluens A: 0,1% ecetsav, B eluens: 0,1% ecetsav-35% acetonitril, gradiens 0-10' 5%B, 5-100% B/20', áramlási sebesség 10 µl/perc

A peptidkönyvtár minőségi és mennyiségi összetételének pontosabb meghatározásához vezet, ha a tömegspektrometriás mérés előtt a komponenseket kromatográfiásan elválasztjuk. A készülék MS/MS képességeit kihasználva akár elválasztás nélkül is azonnal szerkezeti információt kaphatunk az egyes peptidekről. A HPLC elválasztás, amennyiben elkülöníti az izobár peptideket, természetesen javít a spektrumok minőségén.

Az izobár peptidek kromatográfia nélküli megkülönböztetéséhez, jelenlétük igazolásához nagyfelbontású tömegspektrométerre van/volt szükség [150, 151]. NanoESI-FT-ICR

készüléken a danzil-Ala-X-Arg-NH₂ könyvtár minden eleme külön-külön detektálható volt. Köszönhetően a $m/\Delta m \approx 91000$ felbontásnak, még a 0,0364 mDa különbségű danzil-Ala-Gln-Arg-NH₂ és a danzil-Ala-Lys-Arg-NH₂ is mérhető volt (28. ábra).



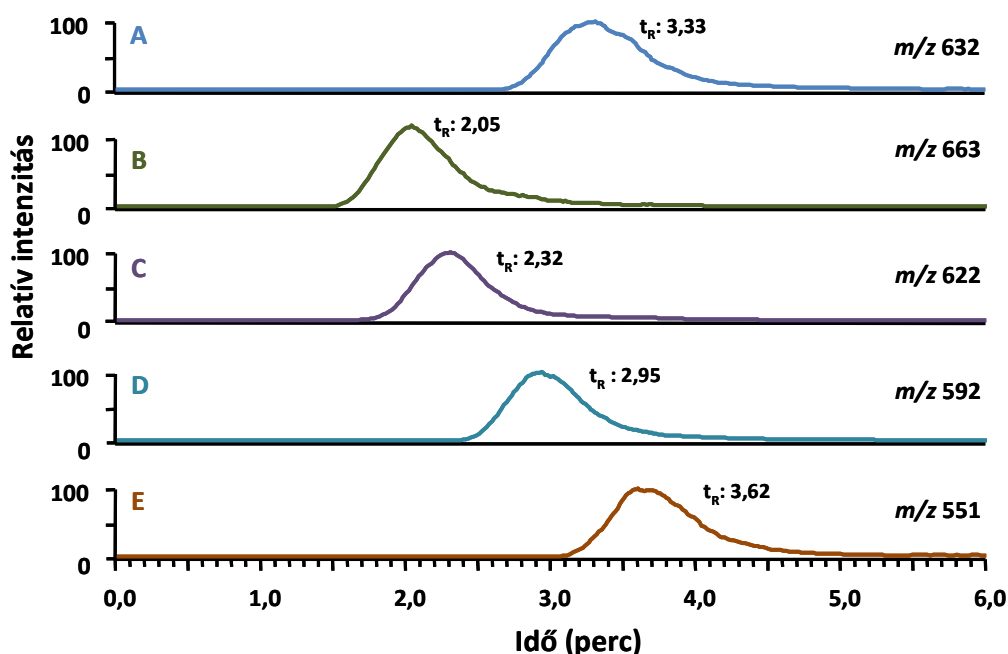
28. ábra

A danzil-Ala-Gln-Arg-NH₂ és a danzil-Ala-Lys-Arg-NH₂ peptidek megkülönböztetése nano-elektrospray FT-ICR tömegspektrométeren

Ha megnöveljük a kombinatorikus könyvtár méretét, pl. elkészítjük a danzil-X₁X₂-Arg-NH₂ könyvtárat, jelentősen megnő a lehetséges vegyületek száma ($19 \times 19 = 381$) és vele együtt a topoizomerek és izobár peptidek száma. A komponensek nagy száma miatt túl sok használható információt nem lehet levonni az MS spektrumból és néhány kivételtől eltekintve jó MS/MS spektrum sem volt készíthető. Ekkora könyvtárról már a nanoESI FT-ICR készülék sem adott kielégítő eredményt, pl. a lehetséges 161 különböző molekulatömegű komponensből csak 102-t tudott detektálni. Az izobár peptidek megkülönböztetéséhez szükséges nagyságú felbontást nem sikerült mindig elérni: pl. az azonos pontos tömegű danzilezett és amidált Asp-Ile/Leu-Arg, Ile/Leu-Asp-Arg, Glu-Val-Arg, Val-Glu-Arg (m/z 635,2976) külön lehetett detektálni a danzilezett és amidált Met-Pro-Arg, Pro-Met-Arg, Asn-Asn-Arg csoporttól, azonban az utóbbiak egymástól való megkülönböztetése nem volt lehetséges (m/z 635,2798 és 635,2724).

Gyógyszerjelöltek biológiai membránokon való átjutását akkor modellezzik jól a mesterséges membránokkal végzett kísérletek, ha a molekula feltételezhetően passzív transzporttal jut el a hatás színhelyére. A peptidkönyvtárak komponensei lipofil tulajdonságainak nagy áteresztőképességű meghatározásához néhány korábbi könyvtárból kiválasztott peptid viselkedését tömegspektrométerhez kapcsolt IAM kromatográfiás oszlopon is megvizsgáltunk. Az együttesen bejuttatott 7 peptid az oszlopon nem vált szét alapvonalra,

de az egyes komponenseket ionjaik tömegspektrometriás detektálásával meg lehetett határozni (29. ábra).



29. ábra

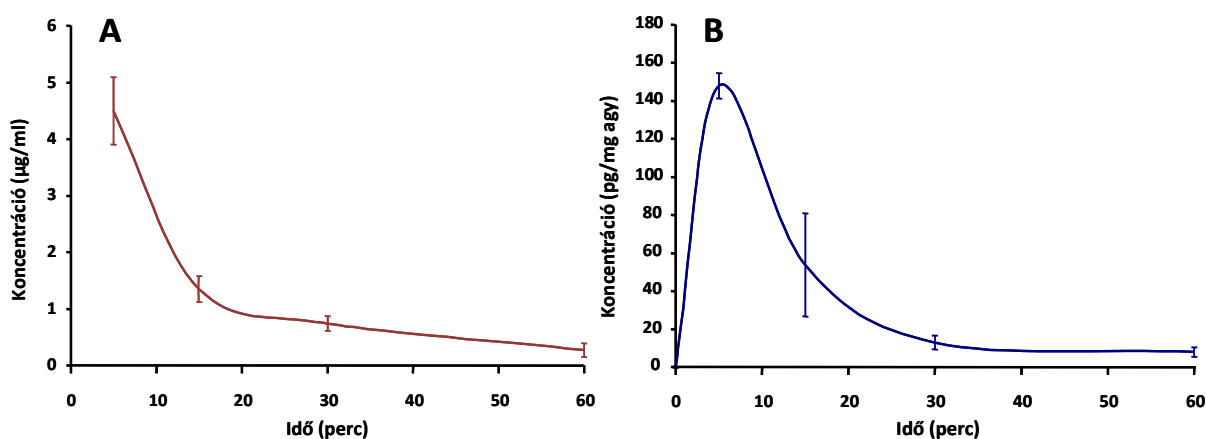
Danzilezett PQR-NH₂ (A), QQR-NH₂ (B), QSR-NH₂ (C), GQR-NH₂ (D) és GSR-NH₂ (E) IAMC-ESI-MS kromatogramjai

Kromatográfia: 4,6 x 30 mm IAM.PC.DD oszlop, 10 mM ammónium-acetát puffer (pH 5,4), 1 ml/perc
MS: ESI ionforrás, 4250 V, kapilláris hőmérséklet 200 °C, MS: 2 x 200 ms, AGC 1 x 10⁶, MS/MS 2 x 200 ms, AGC 1 x 10⁷, prekursor kiválasztás 1,0 Da, 1,75 V

Legerősebb kölcsönhatást az oszlop foszfatidilkolin-szerű láncával a danzil-GSR-NH₂ peptid alakított ki, míg a danzil-KQR-NH₂ gyorsan keresztülment az oszlopon, ami a kisebb foszfolipofilitás jele. A foszfolipofilitási sorrend: KQR < QQR < KSR < QSR < GQR < PQR < GSR, ami eltér az aminosavak hidrofóbicitását jelző Bull-Breese konstansok összegéből számított hidrofóbicitási sorrendtől: QQR < GQR < KQR < QSR < GSR < KSR < PQR. Ez az eltérés is jelzi, hogy az IAMC oszlopon nem csak a molekula hidrofóbicitása, de más tulajdonságai is közrejátszanak a kölcsönhatás kialakulásában. Reményeink szerint a foszfolipofilitási sorrend tükrözi a különböző peptidek vér-agy gáton történő átjutási képességét.

A korábbi vizsgálatokban legerősebb neuropeptid FF antagonistá hatással rendelkező danzil-Pro-Gln-Arg-NH₂ peptidnek „multi-rat study”-ban i.v. beadás után meghatároztuk a vérből történő eltűnésének és az agyba való bejutásának/eltűnésének időgörbét. Az LC-MS/MS kvantitatív mérések megbízhatóságának növelése érdekében belső standardként danzil-Pip-

Gln-Arg-NH₂-t (Pip: pipekolinsav vagy homoprolin) adtunk a mintákhoz, melynek mind a szerkezete, retenciós ideje és ionizációs képessége hasonló a vizsgálni kívánt peptidhez. Kalibrációs görbe alkalmazásával referens plazmaminták koncentrációját $\leq 10\%$, agyminták koncentrációját pedig $\leq 20\%$ eltéréssel tudtuk meghatározni. Az egy időpontban három patkány plazma és szövetsúlyra vonatkoztatott koncentrációit átlagolva ábrázoltuk a danzil-Pro-Gln-Arg-NH₂ koncentrációjának időbeli változását a vérben és az agyban (30. ábra). A peptid vérből történő kiürülését két-kompartmentes farmakokinetikai modell szerint értékelve felezési ideje ($t_{1/2}$) a gyors, megoszlási fázisban 5 perc, míg a lassú, eliminációs fázisban 35 perc. Az agyban maximális peptidkoncentrációt (~ 120 ng/g) 5 percnél tapasztaltuk, azonban 30 perc múlva alig tudtunk beadott anyagot kimutatni.



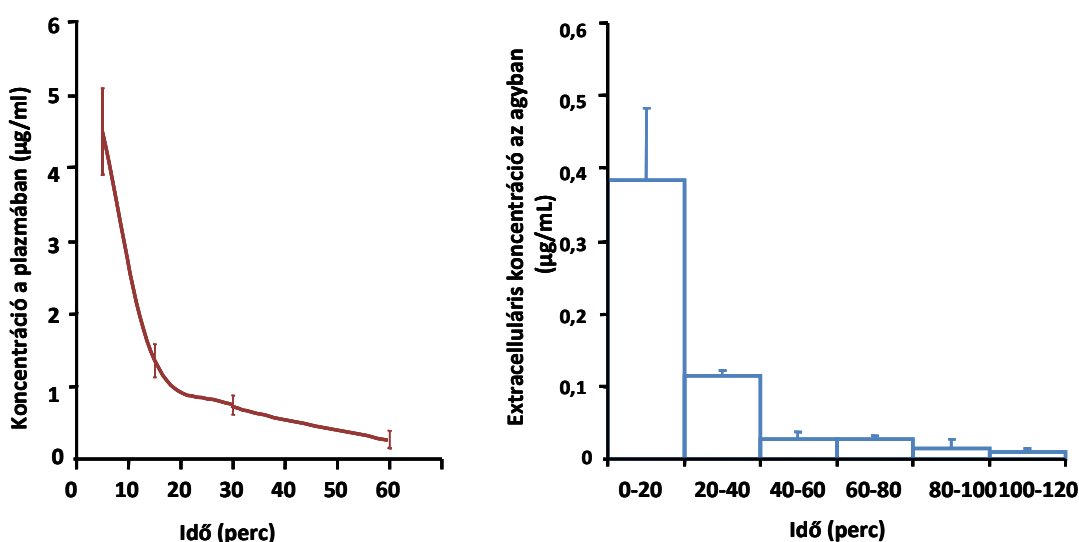
30. ábra

Danzil-Pro-Gln-Arg-NH₂ koncentrációjának alakulása patkány plazmában (A) és agyában (B) i.v. adás után (időpontonként $n = 3$, SEM)

Egy központi idegrendszeri támadáspontú szernek át kell jutnia a vér-agy gáton és az extracelluláris térben megfelelő koncentrációt kell elérnie. Az agyminták hosszadalmas feldolgozása, a nem elég érzékeny detektálás és a mért peptid kétséges eredete miatt (valóban átjutott-e a vér-agy gáton, vagy csak az agyszövetben lévő vér peptidtartalmát mértük) a vizsgálatot más módon: *in vivo* mikrodialízist alkalmazva [152] is elvégeztük. Az agyba (striátum) egy kanülön keresztül féligáteresztő membránt (20 kDa alatt enged át) tartalmazó tűt ültettünk, melyet mesterséges cerebrospinalis oldattal folyamatosan öblítve (1 µl/perc) megfelelő analitikai módszerrel monitorozni lehet az intersticiális folyadék peptidkoncentrációját. (Előkísérletben meghatároztuk, hogy a mikrodialízis tú milyen határfokkal engedi át a danzil-Pro-Gln-Arg-NH₂ peptidet, s végeredményt ezzel az értékkel korrigáltuk.) Kapilláris oszlop alkalmazásával növelni lehet a kromatográfiás módszerek

érzékenységét, ezért a mikrodializátumot 0,3 mm x 50 mm TARGA C18 oszlopon kromatografálva MS/MS-sel analizáltuk. Hasonlóképpen az előző kísérlethez, 4 mg/kg danzil-Pro-Gln-Arg-NH₂ i.v. adása után, de most egy azonos állaton vizsgáltuk a peptid agyi koncentrációjának időbeli alakulását. A mikrodializátumot szakaszosan (20 perces frakciók) gyűjtöttük, majd mindenféle mintaelőkészítést mellőzve végeztük el az LC-MS/MS vizsgálatot (31. ábra).

A bemutatott eljárásnak több előnye van a korábbihoz képest: az agyba valóban bejutó vegyület szintjét lehet meghatározni; nincs szükség mintaelőkészítésre, s az egész 120 perces kísérlethez 3 patkányra volt szükség és még az utolsó időpontban is releváns mennyiségű peptidet lehetett detektálni. A különböző időpontokban származó minták itt azonos állatból származnak, jelentősen növelve az eredmények megbízhatóságát a több állaton végzett kísérletekhez képest.



31. ábra

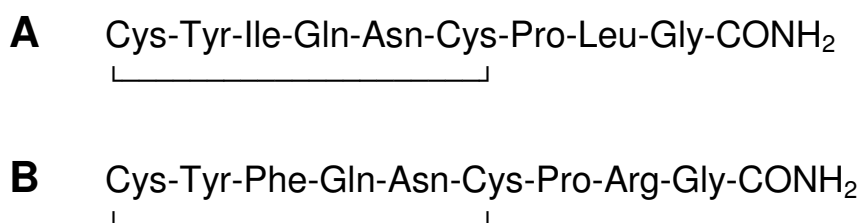
Danzil-Pro-Gln-Arg-NH₂ farmakokinetikai profilja vérből (A), ill. agyból (B), mikrodialízissel gyűjtött frakciókból meghatározva (n = 3, SEM)

Amikor ezeket a mikrodialízises vizsgálatokat végeztük, a módszer felhasználása ritka volt a központi idegrendszerre ható új szerek vizsgálatában.

3.4.2. A neurohipofízis oxitocin és vazopresszin szintetizálóképességének igazolása [XXIV]

Míg a hipofízis elülső lebenyéből számos peptid és fehérjehormon szekretálódik, addig a hátsó lebenyből jelentős mennyiségben csak két peptidhormon, az oxitocin és a

vazopresszin választódik ki (32. ábra). Az oxitocin szabályozza a simaizmok működését és fontos szerepe van a szülés megindításában. Szülés alatti felszabadulása méhösszehúzódnásokat okoz, míg szoptató nőkben elősegíti az emlőből a tej kiürülését és később felelős a gyermek és az anya közötti bensőséges kapcsolat kialakításában. Ezeken kívül számos fiziológiás és patofiziológiás szerepe van (szexuális aktivitás, szociális kapcsolatok kialakulása, stresszoldás, diabetesz, osteoporózis stb.) [153]. A vazopresszin a hipotalamusz magvaiban az oxitocinnal együtt termelődő, a neurohipofízisben tárolt hormon. A szöveti permeabilitás megváltoztatásával elősegíti a vese tubulusainak reabszorbeáló hatását, így szerepet játszik a víz (ADH: antidiuretikus hormon), glükóz és sók homeosztázisának szabályozásában. Növeli a perifériális erek összehúzódnását, így növeli a vérnyomást. A központi idegrendszerben szerepet játszik a hosszú és rövid távú memória kialakulásában is [154].



32. ábra

Az oxitocin (A) és a Arg⁸-vazopresszin (B) aminosavszekvenciái

Mindkét peptidről ismert, hogy a hipotalamusz supraopticus és paraventriculáris magvaiban termelődnek és a neurosecretorios granulomokba csomagolva axonális transzporttal kerülnek le a hipofízis hátsó lebenyébe. Ott az idegsejtek terminális üregeiben tárolódnak, majd inger hatására a véráramba ürülnek. Hasonlóan más felszabadító és gátló hormonhoz, mindkét peptid egy nagy fehérje prekursor molekula formájában képződik, mely tartalmazza az oxitocin és a vazopresszin hordozófehérjéit, a neurofizineket is. A prekursor molekula hasítása az axonális transzport alatt történik, így a terminálisokban már mint szabad peptidek raktározódnak [155]. E centrális dogmának ellentmondó több kísérleti eredmény arra utalt, hogy a hipotalamuszon kívül más, központi idegrendszeri, ill. perifériális sejt is forrása lehet ezeknek a hormonoknak [156]. Így oxitocin mRNS-t és vazopresszin mRNS- mutattak ki a hipofízis elülső és hátsó lebenyében [157, 158], a herékben és az ováriumban is [159], így felvetődött a gondolat, hogy helyben ezekben a szövetekben is termelődhetnek [160].

Senkinek sem sikerült azonban a hormonok szintézisét ezekben a szervekben igazolni, mert az mRNA jelenléte még nem elegendő bizonyíték a fehérjeszintézisre.

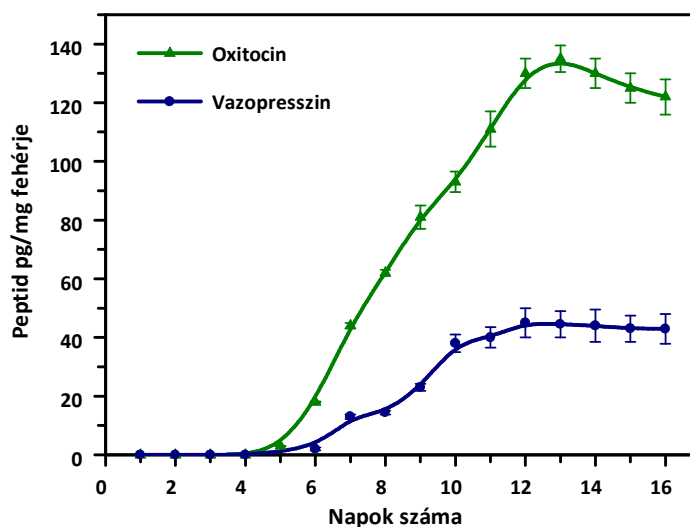
Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy valóban történik-e hormonszintézis a neurohipofízisben.

Kísérletek

Hím Wistar patkányból eltávolított neurohipofízis szövetet enzimatikusan és mechanikusan diszpergáltuk, majd megfelelő körülmények között egyrétegű sejt kultúrát alakítottunk ki. A sejt kultúrák felülszójából saját fejlesztésű specifikus oxitocin [161] és vazopresszin [162] radioimmunoassay-vel (RIA) naponta hormonmeghatározást végeztünk. Azokból a mintákból, amelyekben radioimmunoassay-vel oxitocin és vazopresszin immunreaktivitást mutattunk ki, összeöntés után a peptideket extraháltuk, majd LC-MS rendszerben célzottan kerestük a két peptidet. A analízist saját fejlesztésű kapilláris HPLC oszlopon, on-line kapcsolt, saját fejlesztésű mikroeletrospray ionforrással felszerelt TSQ-7000 hármass kvadrupól tömegspektrométerrel végeztem.

Eredmények és megbeszélésük

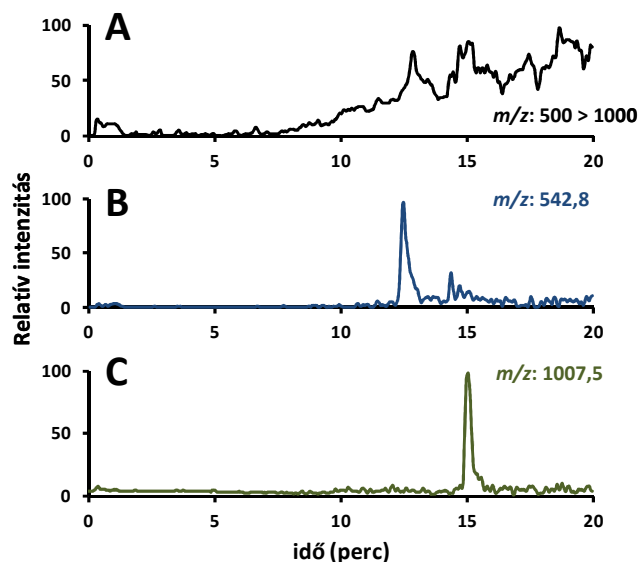
A sejt kultúra készítése közben a sokszori mosás hatására az első néhány napban nem tudtuk sem oxitocin, sem vazopresszin jelenlétét kimutatni. A 6-10 nap között mind a két hormon koncentrációja növekedett, majd a 12-14. napra állandósult: az oxitocin koncentrációja (129 ± 14 pg/mg fehérje) közel háromszorosa volt a vazopresszin koncentrációjának (42 ± 4 pg/mg fehérje) (33. ábra). RIA-val – bár mind a két peptidre specifikus antiszérumokkal rendelkezünk – természetéből adódóan csak vazopresszin- és oxitocin-szerű aktivitásokat lehet kimutatni. Ezért a peptidek sejtenyészetből való azonosítását kapilláris LC-MS rendszerben is elvégeztem. A sejtenyészet felülszójának extraktumát tömegspektrométerhez kapcsolt fordított fázisú kapilláris kromatográfiával vizsgálva a totál-ion kromatogramon nem volt a peptidek jelenlétére utaló jel (34/A. Ábra), azonban az oxitocin molekulaionjának (m/z 1007,6) extrahált ion-kromatogramján 15,11 percnél megjelenő csúcsa (34/C. ábra) megfelel a szintetikus oxitocin retenciós idejének (23/C. ábra).



33. ábra

Az oxitocin és vazopresszin koncentrációjának időbeli változása specifikus radioimmunoassay-vel meghatározva ($n = 10$, átlag $\pm$ SEM)

Hasonló következtetéseket lehet levonni az 1084,5 molekulatömegű vazopresszin LC-MS kromatogramjából: a kétszeresen töltött ion (m/z 542,8) extrahált ion-kromatogramján egyetlen csúcsot ($t_R = 12,47$ perc) látunk (34/B. ábra), ami egyezik a szintetikus vazopresszin retenciós idejével (23/B. ábra).



34. ábra

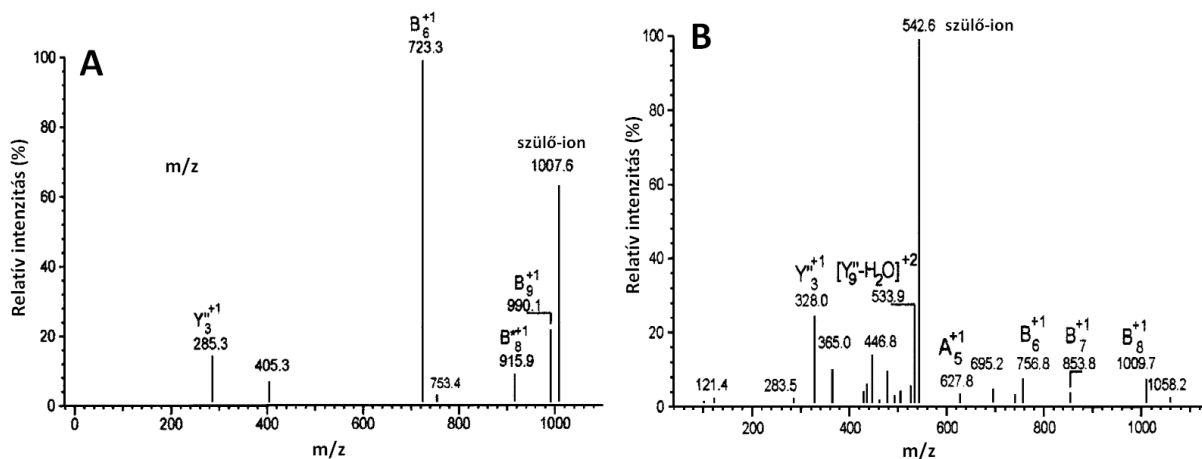
Neurohipofízis sejt kultúra felülúszójának LC-MS kromatogramja

A: totál-ion kromatogram, **B:** a vazopresszin $[M+2H]^{2+}$ extrahált-ion kromatogramja (m/z 542,8), **C:** az oxitocin $[M+H]^+$ extrahált-ion kromatogramja (m/z 1007,6)

HPLC: 320 μ m x 150 mm Nucleosil 5C18 100Å oszlop, A eluens: 0,2% ecetsav, B eluens 0,2% ecetsav-80% acetonitril, gradiens: 5-95% B/20 perc, áramlási sebesség 150 μ l/perc leosztás ~1:100

MS: mikroeletrospray feszültség: 2 kV, kapilláris hőmérséklet: 250 °C

Azt, hogy a sejtenyészetben mind a két hormon a természetes nonapeptid formában van jelen, egyrészt a szintetikus peptidekkel megegyező retenciós időkkel és a molekulatömegekkel, másrészt CID spektrumokból nyert szekvenciaadatokkal igazoltuk (35. ábra).



35. ábra

Neurohipofízis sejtkultúra felülszójából készített MS/MS spektrumok

A: a 12,47 percnél eluálódó vazopresszin $[M+2H]^{2+}$ (m/z 542,8) ionjának MS/MS spektruma

B: a 15,11 percnél eluálódó oxitocin $[M+H]^+$ ionjának (m/z 1007,5) ionjának MS/MS spektruma

MS/MS körülményei: ütközési gáz Ar, 2,5 mTorr, ütközési feszültség: m/z érték 1/35 része

Először sikerült extrahipotalamikus sejtekben vazopresszin és oxitocint szintézist kimutatnunk. A neurohipofízisben a hipotalamuszból induló axonok végződése, hajszálerék és neuroglia-szerű, ún. pituicita sejtek vannak. Mivel az idegsejtek axonjaiban nincs fehérjesszintézis, így a peptidek szintézise a pituicita sejtekben történhet. A neurohipofízisben kimutatott vazopresszin és oxitocin mRNS-ek a rövidebb poli(A) farokban különböznek a hipotalamuszban találhatóktól [163]. A pituicita sejtek vazopresszin-mRNS tartalma ozmotikus hatásokra változik [164].

Eredményeink azt a hipotézist támogatják, hogy a neurohipofízis sejtjei valóban tartalmazzák mind a vazopresszin, mind az oxitocin mRNS-ét, melyek megfelelő körülmények közé kerülve kódolják a két peptid beinduló szintézisét [160]. A peptidszintézis és kiválasztás dopaminerg kontrol alatt van, mert a dopamin, apomorfín és Pro-Lys-Gly tripeptid által okozott megnövekedett peptidszintézis dopamin-receptor antagonistá haloperidollal, klórpromazinnal és sulpiriddel kivédhető [XXV].

3.4.3. Ciklin-függő kináz – inhibitor azonosítása lucernasejtből [XIX]

Az eukarióta sejtek sejtosztódási ciklusa szigorúan kontrollált folyamat. A sejtciklus regulációja a szervezet növekedés-szabályozásának sejt szintű alapja. Ennek a szabályzásnak a ciklinek, a ciklin-függő kinázok (cyclin-dependent kinase, CDK) és a ciklin-függő kináz inhibitorok (cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI) a fő komponensei, ahogy azt számos fajban kimutatták [165, 166]. A kinázok mennyisége a sejtciklus során állandó, aktivitásuk azonban a ciklinek által, több szinten szabályozott módon változik. A CDK-k aktiválódásának elengedhetetlen feltétele, hogy bizonyos ciklinekkel komplexet képezzenek. A komplexek a sejtciklus különböző fázisában eltérő szerkezetűek és összetételűek. További feltételek még a CDK-k bizonyos aminosavakon történő foszforilálódása, ill. kölcsönhatás kialakulása a CKI-kal. Élesztőből és emlős sejtekből többféle CKI-t izoláltak [167], azonban munkánk idején növényekben csak egy CKI volt ismert [168]. A lucerna sejtosztódási ciklusainak jobb megismerése érdekében újabb CKI kereséséhez kezdtünk.

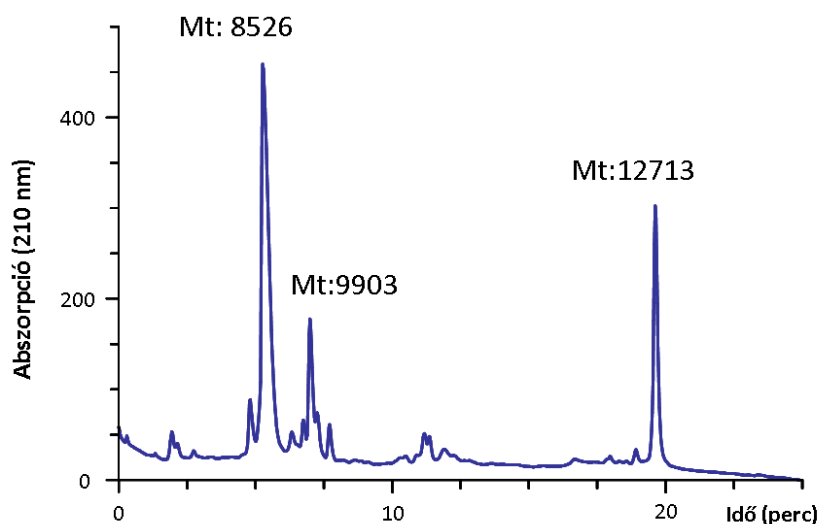
Kísérletek

Lucerna (*Medicago sativa* A2) sejtenyészet homogenizátumából MonoQ ioncserélő oszlopon végzett kromatográfia után a frakciók CKI aktivitását a kináz-gátlási assay-ben határoztuk meg [169]. A CKI-aktív frakciót fordított fázisú kromatográfiával tovább frakcionáltuk, és meghatároztuk a benne található komponensek CKI aktivitását és molekulatömegeit. A fehérjetermészetű aktív komponens azonosításához SDS-PAGE gélelektroforézist végeztünk, majd gélben történő emésztéssel hidrolizáltuk a fehérjét. A kapott peptidkeveréket saját készítésű fordított fázisú kapilláris kromatográfiás oszlopon választottuk szét. Az egyes peptideket a házi készítésű mikroeletrospray kapcsolóegységen (interface) keresztül on-line kapcsolt TSQ-7000 hármaskvadropól tömegspektrométer segítségével analizáltuk. Az LC-MS kromatogramon három legintenzívebb peptidcsúcsnak MS/MS kísérletben meghatároztuk a szekvenciáját.

Eredmények és megbeszélésük

Lucernasejtek homogenizátumának ioncserés, majd fordított fázisú HPLC kromatográfiával (36. ábra) ciklin-függő kináz inhibitor hatással rendelkező, 8565 Da molekulatömegű fehérjét találtunk.

dc_272_11



36. ábra

Lucernasejtekből izolált, CKI aktivitással rendelkező fehérjekeverék HPLC kromatogramja
HPLC: 2,1 x 100 mm Nucleosil 5C18 (300Å) oszlop, A eluens 0,2% ecetsav, B eluens 0,2% ecetsav 80%
acetonitrilben, gradiens: 20-70%B/50 perc, áramlási sebesség 0,2 ml/perc

Az SDS-PAGE gél 7-10kDa körüli sávját kivágva, a benne lévő fehérjé(ket) tripszinnel emésztve, majd a peptidkeverékből HPLC-MS analízist végeztünk a benne lévő peptidek molekulatömegének meghatározására („peptid tömeg térképezés”, lásd 4.1. fejezet). A Profound szoftverrel SwissProt adatbázisban végrehajtott keresés első körben több fehérjetalálatot is adott, azonban közülük legvalószínűbbnek, 72%-os szekvencialefedettséggel az ubiquitin bizonyult. A feltételezett szekvencia birtokában megvizsgáltuk a LC-MS kisebb intenzitású csúcsait, s a kapott peptidek az ubiquitin teljes szekvenciáját lefedték (2. táblázat)

2. Táblázat

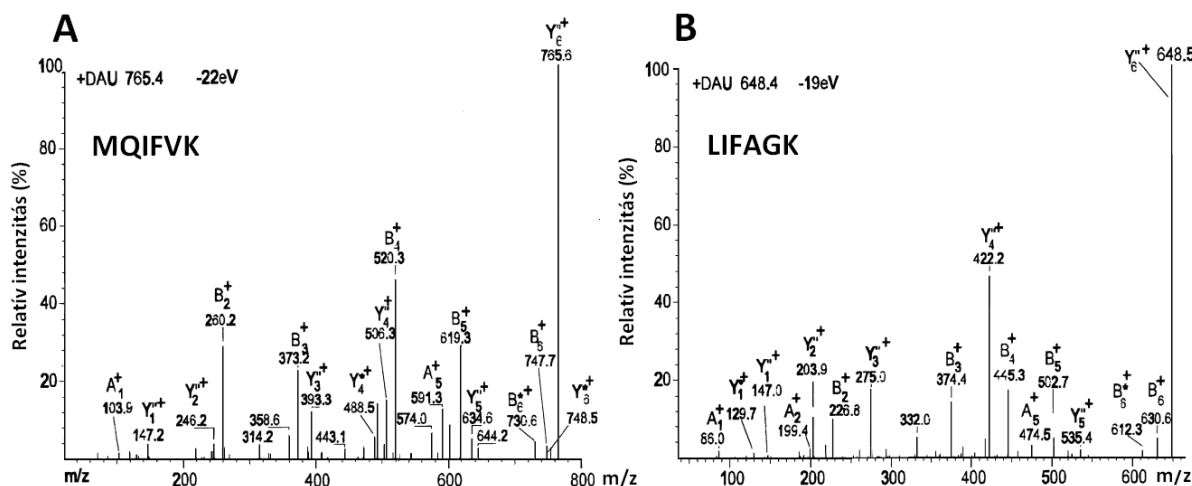
Az ubiquitin „peptid tömeg térképe”

Szakasz	Szekvencia	Számolt Mt	Mért Mt
1-6	MQIFVK	764,5	764,4
1-27	MQIFVKLTGKTITLEVESSDTIDNVK	3009,6	3011,2
12-27	TITLEVESSDTIDNVK	1762,9	1763,6
28-33	AKIQDK	701,4	701,1
30-42	IQDKEGIPPDQQR	1522,7	1523,4
43-48	LIFAGK	647,4	647,5
55-63	TLADYNIQK	1064,6	1064,8
55-72	TLADYNIQKESTLHLVLR	2113,2	2114,2
64-72	ESTLHLVLR	1066,6	1066,9
55-76	TLADYNIQKESTLHLVLRRLGG	2496,4	2497,5

A „peptid tömeg térkép” eredményeinek megerősítésére az LC-MS három intenzív ionjából (m/z 765,4, 648,4 és 533,3) – amelyek az ubiquitin szekvenciájának elejéről (1-6), közepéről (43-48) és végéről (64-72) származnak – MS/MS spektrumokat készítettünk (37. ábra).

A 765,4 és 648,4 ionok CID spektrumában teljes **b**- és **y**-ionsorozatot láttunk, amelyek igazolták a MQIFVK, ill. LIFAGK szekvenciákat, míg a 533,3 $[M+2H]^{2+}$ ion MS/MS spektrumában a TLADYNIQK peptidet az 5 C-terminális és 5 N-terminális ionnal azonosítottuk.

Az ubiquitin szerepe jól ismert a sejtciklust szabályzó fehérjék lebontásában [170]. A ubiquitin-proteasóma rendszer által szabályzott proteolízis fontos útvonala a nem-lizoszomális fehérjék degradációjának. A sejtciklus számos kritikus eleme, így a p27, p53, E2F, c-Myc, c-Jun és c-Fos bomlik le ezen az útvonalon. Így az ubiquitin közvetett CDK-gátló hatása ismert, azonban direkt hatásáról eddig nem voltak ismereteink.



37. ábra.

Az ubiquitin két triptikus fragmensének: a 765,4 $[M+H]^+$ (A) és a 648,4 $[M+H]^+$ (B) ionok MS/MS spektrumai, ütközési gáz: argon (2,5 mTorr).

3.4.4. *Streptomyces griseus*-ből származó C-faktor fehérje azonosítása [XXVI-XXVII]

A streptomycesek Gram pozitív, aerob, fonalas növekedésű, elsősorban talajban élő baktériumok. Tanulmányozásuk elméleti szempontokon túl azért fontosak, mert a morfológiai differenciálódásukkal párhuzamosan lejátszódó fiziológiai/biokémiiai differenciálódásuk során nagyszámú, a gyógyászatban, mezőgazdaságban és az iparban is alkalmazható anyagot (antibiotikum, pigment, enzim, enzim inhibitor, rovarellenes szer, immun-modulátor, antitumor hatású vegyület stb.) termelnek [171]. Extracelluláris szabályzó fehérjék, ún.

autoregulátorok kulcsszerepet játszanak a streptomycesek differenciálódásában, a sejtek közötti kommunikációban és másodlagos metabolizmusban [172]. Egy ilyen autoregulátor fehérje a C-faktor [173], melyet többlepcsős kromatográfiával *S. griseus* 45H törzs fermentlevéből izoláltak [174]. A C-faktor 29 aminosavból álló N-terminális része homológiát mutatott számos cink-ujj típusú szabályzó fehérjével, sőt Zn-affinitás oszlopon tisztítható is volt [175]. Más bizonyítékokkal együtt arra lehetett következtetni, hogy a C-faktor egy cink-ujj típusú szabályzó fehérje. Amikor azonban génjét szekvenálták, a származtatott teljes aminosavszekvencia már nem támasztotta alá ezt az elképzelést. Azért, hogy független módszerrel meggyőződjünk a fehérje szerkezetéről, a tömegspektrometriás fehérjeanalízist hívtuk segítségül.

Kísérletek

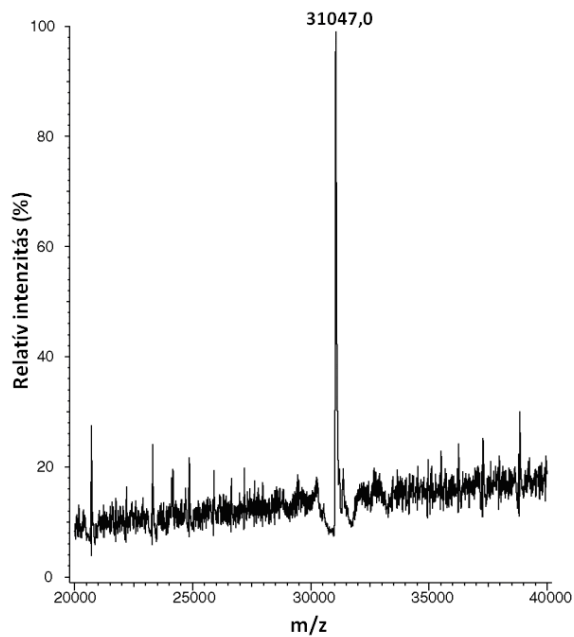
A tisztított C-faktor tisztaságának és molekulatömegének meghatározásához LC-MS analízist végeztünk a laboratóriumunkban készített kapilláris HPLC oszlop és mikroESI ionforrás alkalmazásával TSQ-7000 hármass kvadrupól tömegspektrométeren. A poliakrilamid gélben tovább tisztított fehérje sávját kivágtuk, DTT-vel redukáltuk, jódiacetamiddal alkileztük, majd tripszinnel megemésztettük. A fehérjehidrolizátumból HPLC-MS analízist végeztünk a benne lévő peptidek molekulatömegének meghatározására („peptid tömeg térképezés”). A bioinformatikai adatbázis-kereséssel (ProFound, SwissProt) kapott fehérje szekvenciáját MS/MS mérésekkel is hitelesítettük.

Eredmények és megbeszélésük

A C-faktor génje egy 324 aminosavas fehérjét kódol, aminek N-terminális 38 aminosavat tartalmazó része szignálpeptidként lehasad. Az érett 286 aminosavból álló fehérje molekulatömege 31038 Da, amivel jól egyezik az LC-MS analízissel meghatározott 31047 ± 5 Da tömeg (38. ábra). A fehérje alapos tisztításon ment keresztül, mert nem találtunk mellette számottevő szennyezést.

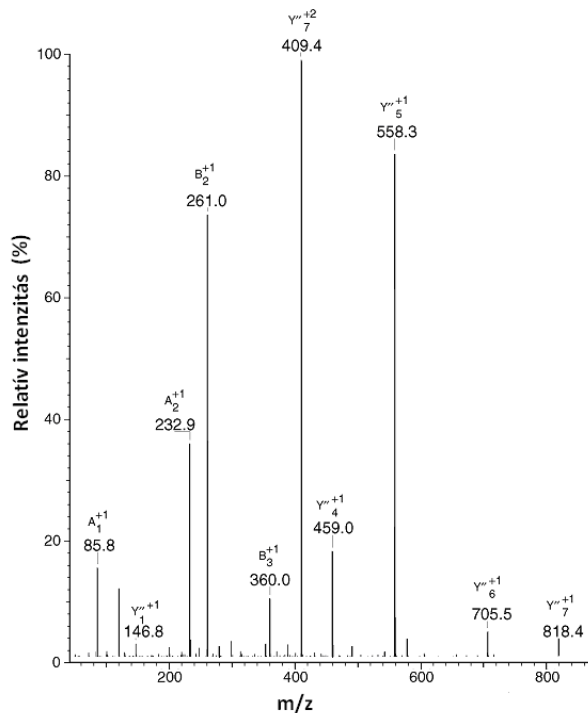
A fehérjehidrolizátum LC-MS analízisével talált peptidek molekulatömeg-adatai alapján az adatbázis-keresés 100%-os valószínűséggel azonosította a *Streptomyces* C-faktor fehérjéjét (Q9Z4K0). A 11 megtalált fragmens mind a helyére volt illeszthető, és a fehérje teljes szekvenciájának 32,7%-át lefedte. A megtalált peptidek szekvenciájának azonosításához MS/MS méréseket végeztünk. Mind a 11 peptidről jól értékelhető leányion (MS/MS) spektrumot kaptunk, csaknem mindig teljes **b**- és **y**-ion-sorozattal. Példaképp bemutatom a fehérje 41-47 peptidjének MS/MS spektrumát (39. ábra).

dc_272_11



38. ábra

S. griesus-ból izolált C-faktor dekonvolúció utáni MS spektruma
HPLC: 320 μm x 100 mm Vydac C4 (300 Å, 5 μm) oszlop, A eluens: 0,04% TFA, B eluens: 0,05% TFA-80% acetonitril, gradiens 5-90%B/30 perc, áramlási sebesség 3 μl /perc
MS: mikroESI interface, feszültség: 1200 V, 10-2500 m/z



39. ábra

S. griseus-ból izolált C-faktor fehérje 41-47 helyzetű peptidjének MS/MS spektruma ($[M+2H]^{2+}$, m/z 409,4)
HPLC: 320 μm x 200 mm Vydac C18 (300 Å, 5 μm) oszlop, A eluens: 0,04% TFA, B eluens: 0,05% TFA-80% acetonitril, gradiens 5-90% B/30 perc, áramlási sebesség 3 μl /perc
MS: mikroESI interface, feszültség: 1200 V, ütközési energia: $-(m/z/35 \text{ eV})$,
ütközési gáz: argon (2,5 mTorr).

A szekvenciaszinten is megerősített peptidek adatait a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat
S. griseus-ból izolált C-faktor fehérje MS/MS-méréssel igazolt szakaszai

Szakasz	Szekvencia	Számolt Mt	Mért Mt
8-19	FSLTEPSHDLFR	1447,7	1448,1
28-39	VQQSFTFDIVNR	1452,7	1453,0
28-40	VQQSFTFDIVNRR	1608,9	1608,6
40-47	RLFVAQLK	973,6	973,8
41-47	LFVAQLK	817,5	817,7
109-129	LARFKWNGATLSRTSSALAK	2291,3	2290,2
154-160	YLTASGR	766,4	766,5
239-246	AGSTLTFR	851,5	851,4
263-276	LFLGFASGVAGDRR	1464,8	1465,5
277-282	SNLFYK	770,4	770,5
283-286	NVLI	457,3	457,4

Streptomyces törzsekből elsőként azonosítottunk egy sejtdifferenciálódást kiváltó autoregulátor fehérje, a C-faktor aminosavszekvenciáját, mely további kutatásokhoz nyitotta meg az utat.

3.4.5. Hepatitis B vírus X-fehérje szerkezetének felderítése [XXVIII]

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) adatai szerint több mint kétmilliárd olyan ember él a világon, aki valamikor az élete során megfertőződött hepatitis B vírussal (HBV). Ezekből mintegy 360 millió beteg krónikus hepatitis B fertőzésben szenved [176], amely komoly rizikófaktor: a krónikus hepatitis B talaján májzsugor és májrák alakulhat ki [177]. Évente körülbelül 500-700 ezer haláleset történik a hepatitis B vírusfertőzés következtében, holott ez a betegség védőoltással hatékonyan megelőzhető volna.

A hepatitis B vírus (HBV) a *Hepadna viridae* családba tartozó, részlegesen kettőláncú DNS-t tartalmazó vírus. A vírusburokban lévő nukleokapszid tartalmazza a kb. 3,2 kB hosszúságú DNS-t és a polimerázt. A DNS lánc négy „nyitott leolvasási keret”-et („open reading frame, ORF) tartalmaz. Az első ORF a HBV felszíni (pre-S1, pre-S2, S) antigénjeit kódolja. A második ORF-ről a core antigén, a vírus nukleokapszidjának fő komponense szintetizálódik és a szorosan hozzá kapcsolódó HBeAg. A harmadik ORF a vírus polimeráz enzimjét kódolja, mely jelen van a vírus core (HBcAg) partikulumokban, a vírus replikációjának a helyén. A negyedik „nyitott olvasási keret” által kódolt fehérje az X antigén (HBxAg). A HBxAg egy rendkívül konzervatív, 17 kDa-os fehérje, melyre a nagyfokú hidrofóbicitás és a diszulfid-

hidak jellemzők [178]. Ez egy multifunkcionális szabályzó fehérje, amely modulálja a sejtosztódást, a sejtek genotoxikus stresszre adott válaszát, hatással van a fehérjekatabolizmusra és szerepet játszik a jelátviteli folyamatokban, de funkciói pontosan még nem értelmezettek [179].

A HBxAg-ben a 154 aminosavból 80 (54%) hidrofób jellegű, amely biológiai rendszerekben különleges fiziko-kémiai szerkezetet jelent, ezért az alapkutatás számára is érdekes, de igazából diagnosztikus jelentősége lehet, mert kapcsolat van a betegség krónikusból malignus állapotba történő átmenet és a fertőzött májsejtek X-protein expressziója között [180].

Molnár János professzor munkacsoportjával együtt dolgozva, akiknek elsőként sikerült olyan mennyiségben az antigént előállítani és tisztítani [181], hogy szerkezetvizsgálatára sor kerülhessen, munkánk elsődleges célja az X-protein szerkezetének és a kialakult diszulfidhidak pontos helyeinek meghatározása volt.

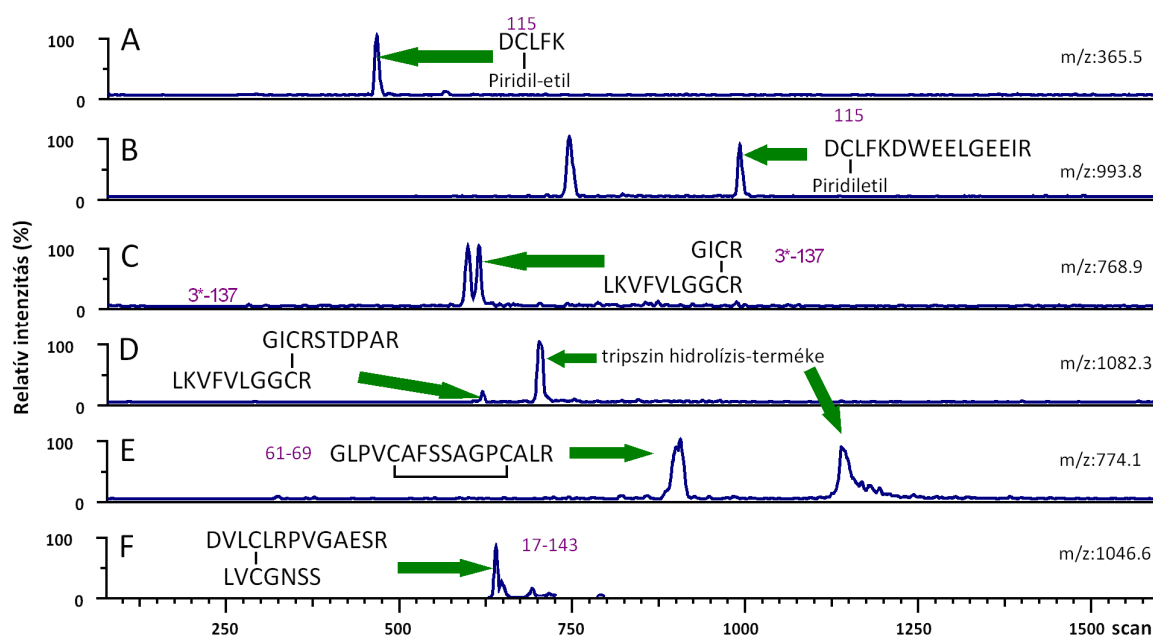
Kísérletek

A rekombináns X-proteint (az X-protein 10-143 szakasza) glutation S-transzferáz (GST) fúziós fehérjeként állították elő *E. coli* DH5a sejtekben [181]. A fehérje zárványtestekből (inclusion body) történő extrakció után a GST-X-proteint 2,66 M karbamidoldatban levegőn történt 24 órás keverés alatt renaturálódott, azaz a cisztein aminosavak diszulfidhidakká zárultak. Xa proteázzal a GST-t eltávolították és a reakció termékét Superdex 75 FPLC oszlopon megtisztították. A PAG elektrofozézissel tovább tisztított fehérjét kaptuk meg szerkezetvizsgálat céljára. A vinil-piridines alkilezést követően a fehérjét 3 órán keresztül tripszinnel elhidrolizáltuk, majd képződött peptidkeveréket kapilláris-LC rendszeren elválasztva tömegspektrométerrel analizáltuk. (Kontrollként vinil-piridines reakció nélkül is végeztünk egy vizsgálatot.) Ismerve az X-protein szerkezetét, számítógépes programmal létrehoztuk az összes lehetséges alkilezett és diszulfidhidas triptikus peptid listáját, majd azt összehasonlítottuk az LC-MS analízis eredményével.

Eredmények és megbeszélésük

A híg oldatban, pH 6,5-n történt renaturáció után kialakult GST-X-protein kedvező szerkezetét jelzi az, hogy az Xa proteáz felismerte és nagyon gyorsan (3 óra) elhidrolizálta a fúziós fehérjét. A hasítás eredményes volt, melynek termékeit méretkizárásos kromatográfiával könnyű volt elválasztani és tiszta formában kinyerni. A vinil-piridin jó alkilezőszer, tioéter képződése közben könnyen addíciónálódik fehérjékben lévő cisztein aminosavakra. Az X-protein hidrolizátumának LC/MS kromatogramján (40/A. és 40/B. ábra)

két vinil-piridines adduktot találtunk 729,2 és 1985,8 molekulatömegekkel (m/z 365,5 és 993,8), amelyek megfelelnek a DCLFK (114-118), ill. a DCLFKDWEELGEEIR (114-128) peptideknek. (Az utóbbi peptidben van egy kihagyott tripszines hasítási hely.) Mind a két peptid hiányzik a vinil-piridinnel nem kezelt fehérje hidrolizátumából, így a rekombináns X-proteinben csak a Cys¹¹⁵ tudott alkileződni (tehát szabadon van), míg a többi 6 cisztein diszulfidhidat képez.



40. ábra

A rekombináns X-protein tripszines hidrolizátumának LC-MS kromatogramja (G) és a kiválasztott ionok kromatogramjai (A-F)

HPLC: 320 x 250 mm C18 (5 μ m, 100Å) oszlop, A eluens: 0,05% TFA, B eluens 0,04% TFA-80% acetonitril, gradiens: 5-90% B/70 perc, áramlási sebesség 150 μ l/perc, leosztás ~1:100
MS: mikroeletrospray, feszültség: 2 kV, kapilláris hőmérséklet: 250 °C

A 1535,9 és 2164,9 Da tömegű peptidek (m/z 768,9 és 1082,3) arra utalnak, hogy a 3 és 137 helyzetű ciszteinek diszulfidhidat képeznek (40/C. és 40/D. ábra). (Az utóbbi peptid két kihagyott tripszines hasítási helyet is tartalmaz.) Az m/z = 1082,3 ionkromatogramján az első csúcs felel meg a X-protein diszulfidhiddal összekapcsolt {1-9}-{128-138} peptidnek, míg a második csúcs a tripszin önmésztesének terméke. Az m/z = 774,1 ionkromatogramon szintén két csúcs látható, melynek egyike megfelelhet a fehérje 57-72 fragmensének (molekulatömeg:1545,7, $[M+2H]^{2+}$ = 773,9), melyben a 61 és 69 helyzetű ciszteinek diszulfidhidat alkotnak (40/E. ábra). Ennek igazolására a fehérje hidrolizátumát DTT-vel redukáltuk, majd vinil-piridinnel reagáltattuk. Az m/z 774,1 kromatogramból eltűnt az első

csúcs és a divinil-piridint tartalmazó 57-72 peptidet megtaláltuk. A második csúcs ismét a tripszinből származik. A harmadik diszulfidhíd már csak a maradék 17 és 143 helyzetű ciszteinek között lehetséges. A fehérje {14-26}-{141-147} triptikus fragmensének molekulatömege 2092,0, melynek kétszeresen töltött ionját meg is találtuk az LC-MS kromatogramon (40/F. ábra).

Az eredmények birtokában felrajzolható a rekombináns HBV X-fehérje szerkezete (41. ábra), melyben a Cys¹¹⁵ szabad és a Cys³-Cys¹³⁷, a Cys⁶¹-Cys⁶⁹ és a Cys¹⁷-Cys¹⁴³ ciszteinek között diszulfidhidak találhatók. Az ábrán az első hat és az utolsó négy aminosav a klónozó vektorból származik.



41. ábra

A rekombináns HBV X-protein szerkezete

Gupta és mtsai más rekombináns módszerrel minimális mennyiségű teljes (1-154) X-proteint állítottak elő [178]. Fehérjéjükben 9 cisztein közül a 148 helyzetű volt szabad, diszulfidhíd érdekes módon minden negyedik cisztein között alakult ki (Cys⁷-Cys⁷⁸, Cys¹⁷-Cys¹¹⁵, Cys⁶¹-Cys¹³⁷, Cys⁶⁹-Cys¹⁴³). Az eltérő mintázatnak az eltérő virális DNS, az ebből következő fehérjeszekvencia-különbségek, ill. a több cisztein lehet az oka.

3.4.6. Monoklonális anti-HBxAg antitestek epitóptérképezése [XXIX]

A HBV genomot hordozó betegekben expresszáldó HBxAg-nek, illetve a vele szemben kialakult immunreaktivitásnak a betegség prognózisa szempontjából alapvető jelentősége van. Az idült májgyulladás, illetve az elsődleges májrák kialakulásának mechanizmusában az immunológiai komponensek tanulmányozásához elengedhetetlennek látszott monoklonális antitestek kifejlesztése és jellemzése. Együttműködő partnerünknek ugyanakkor célja volt egy, a laboratóriumi diagnosztikában hasznosítható immundiagnosztikum kifejlesztése, amihez megfelelő minőségű és jól karakterizált monoklonális antitestre volt szükség.

Az antigén-antitest reakcióban antitestek specifikusa attól függ, hogy az antigén mely szerkezeti elemével, az. ún. epitóppal szemben képződtek. Egy antigén felületén általában több epitóp helyezkedik el, így velük szemben többfajta antitest képződik. A monoklonális antitestek előállításának célja, hogy specifikusan csak egy-egy epitóppal szemben legyenek specifikusak. Az epitópok lehetnek lineárisak, vagyis a fehérjeláncban egymás utáni aminosavak által meghatározottak, ill. nem-folyamatos, ún. konformációs epitópok, amelyeknél a láncban eredetileg távol, de a feltekeredés hatására egymáshoz közel kerülő szakaszok együttesen alakítják ki az antigéndetermináns helyet. Egy antigén epitópjainak feltérképezése lehetőséget ad a monoklonális antitest specifikálásának tervezésére.

Az antigén epitóp helyeinek meghatározására különböző számítógépes predikciós [182] és kísérletes módszerek (oligopeptid szkennelés [183], fág-display [184] stb.) állnak rendelkezésre. A tömegspektrometria előtérbe kerülése a biológiai kutatásokban új módszereket hozott az epitópkutatásban is [185].

Együttműködő partnereink előállítottak néhány monoklonális antitestet a rekombináns X-protein ellen [186] és felvetették a kérdést, hogy azok a HBxAg mely epitópjai ellen specifikusak.

Kísérletek

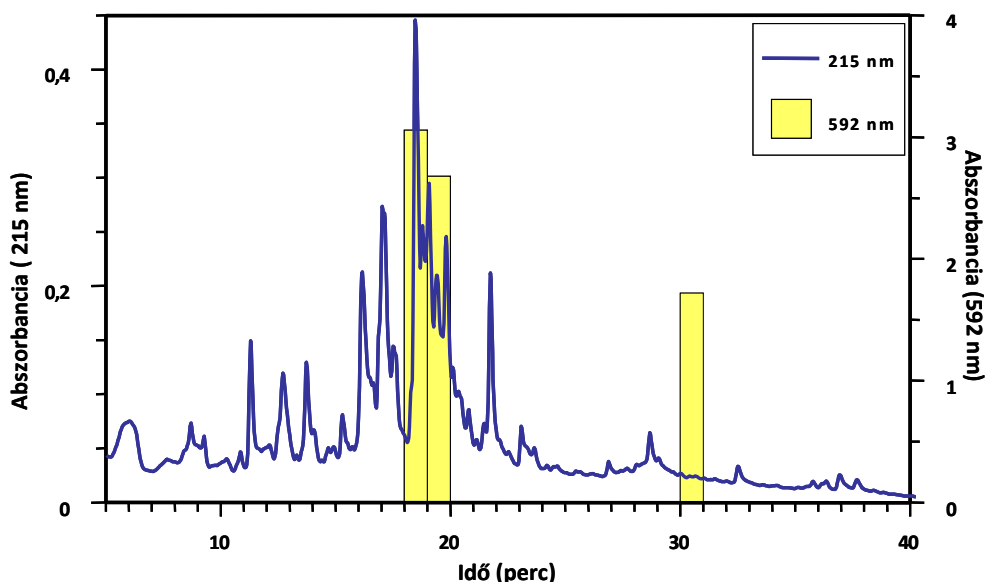
A rekombináns X-protein(10-143) fehérjét redukálás és alkilezés után rövid ideig tartó (3 óra) részleges tripszines hidrolízisnek vetettük alá. A peptidkeveréket analitikai HPLC oszlopon elválasztva 1 perces frakciókra bontottuk. Monoklonális antitestjeink közül egyikkel minden frakcióból kötési tesztet végeztünk (ELISA). A teszten pozitívnak mutató frakciókat a laboratóriumunkban összeállított statikus nanoESI ionforrással felszerelt TSQ-7000 tömegspektrométeren MS/MS módszerrel vizsgáltuk.

Eredmények és megbeszélésük

Wisconsin-CGC számítógépes programcsomaggal (Wisconsin-GCG package, Genetics Computer Group Inc., University Research Park, Madison, WI, USA) kollégáink feltérképezték a rekombináns X-protein lehetséges epitópjait. A Jameson-Wolf és a Welling féle módszerrel történt antigenecitási predikció a 19-31, 55-67 és 100-114 szakaszokat jelölte ki, mint valószínű epitópokat. Az X-protein részleges proteolízisével előállított peptidkeveréket analitikai HPLC oszlopon UV detektálás mellett elválasztottuk (42. ábra).

Monoklonális antissal végzett ELISA-tesztben három frakció adott pozitív immunreakciót. A legnagyobb immunválaszt adó #18 és #19 frakcióban tömegspektrometriával három

peptidet azonosítottunk (m/z 1472,7, 2525,0 és 2552,3), míg a #30-ban a nagyon érzékeny nanoESI ionforrás alkalmazása ellenére sem sikerült peptidet detektálni. (Meg kell jegyezni, hogy az UV detektor sem mutatott semmi jelet erre a frakcióra.) A 1472,1 peptid megfelel a rekombináns HBV X-protein karboximetilezett 14-23 szakaszának (DVLCLRPVGAESR), amit a nanoESI-MS/MS spektrummal igazoltunk.



42. ábra

Rekombináns X-protein proteolízisének HPLC kromatogramja és ELISA teszt eredményei
HPLC: 4 x 250 mm Nucleosil C18 (5 μ m, 300 Å) oszlop, A eluens: 0,1% TFA, B eluens 0,1%TFA-80%
acetonitril, gradiens: 20-60%B/40 perc, 1 ml/perc

A tömegspektrometriás eredményeink alátámasztották a predikció eredményét, mert az egyik valószínűsített epitóp (19-31) átfedett a részleges proteolízis után azonosított 14-23 szakasszal. Ezért feltételeztük, hogy az adott monoklonális antitest a fehérje ezen szakaszára specifikus.

3.5. CE-MS ÉS CEC-MS INTERFACE KIALAKÍTÁSA ÉS ALKALMAZÁSA [XXX-XXXI]

A kapilláris elektroforetikus módszerek tömegspektrométerhez való kapcsolásával a nagyhatékonyságú elválasztást kombinálták a nagy szelektivitású MS detektálással, amely a komponensek molekulatömegén túl azok szerkezetére is felvilágosítással szolgál [187]. A két módszer összekapcsolásában a legnagyobb kihívást a 20-30 kV feszültséget alkalmazó CE és a 3-4 kV-on elektroporlasztást végző ESI-MS ionforrás zárt áramköreinek kialakítása jelentette. Az összekapcsolásra több megoldás is született: „*sheath flow*” módszer [188], az

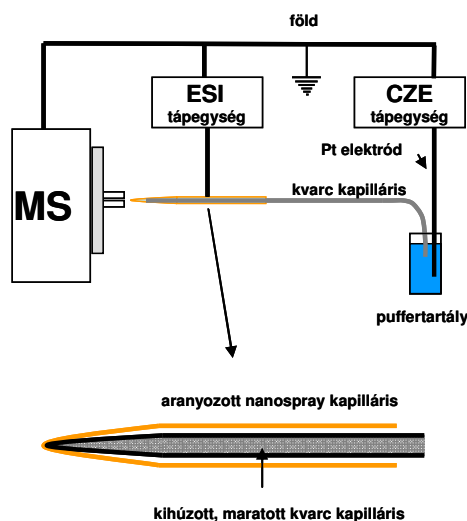
elektroforézis kapilláris áramlásával koaxiálisan alkalmazott „bemosó” folyadék zárta az elektroforézis áramkörét, elősegítette stabil elektrospray kialakulását és lehetővé tette különböző háttérektrólitok alkalmazását is. Az elektroforézis során kialakult nl/perc áramlási sebességhez képest a „sheath liquid” nagyságrend(ek)kel nagyobb térfogatárama egyrészt hígította a mintát, másrészt rontotta az ionizáció hatásfokát, így csökkentette az elérhető érzékenységet. Nanoelektrospray ionforrást és platina drótot tartalmazó koaxiális kapilláris alkalmazásakor javult a módszer érzékenysége [189]. A „liquid junction” interface-ben a CE feszültségét az CE és elektrospray kapillárist összekapcsoló teret kitöltő folyadékra kapcsolták [190], azonban a két kapilláris nem tökéletes összeillesztése lerontotta mind az elválasztás hatékonyságát, mind az érzékenységet. A „sheathless” interface nem alkalmaz „bemosó” folyadékot, így kiküszöböli annak hátrányait. Számos megoldás született erre az interface típusra is [191], melyek többsége időigényes előkészítést, nagy gondosságot igényel és nem alkalmazható széleskörűen.

A fenti hátrányok kiküszöbölésére egy olyan általánosan használható nanoelektrospray-CE (CEC) interface kifejlesztését tűztük ki célul, amelyben a nanoelektrospray kapilláris könnyen illeszthető az elektroforézis kapillárisához és elhasználódása után egyszerűen cserélhető is.

Kísérletek

A hármas kvadrupól Finnigan TSQ-7000 tömegspektrométerünkhöz kifejlesztettünk egy statikus és egy dinamikus nanoelektrospray ionforrást (lásd 3.3.1.2. fejezet). A statikus nanoelektrospray tűjét 0,69 mm belső átmérőjű boroszilikát kapillárisból mikropilláris-húzó készülékkel készítettük el, majd külső felületét arany elpárologtatásával vékony fémréteggel vontuk be. Később ehhez az aranyozott boroszilikát kapillárisához csatlakoztattuk az ESI tápegységet. A kapilláris elektroforézis 50 μm belső (150 μm külső) átmérőjű kvarc kapillárisát gázlángon kihúztuk, csúcsát 48% HF-dal megmarattuk, majd a másik végét úgy vágtuk le, hogy a kapilláris hossza 20 cm legyen. Hasonló kihúzott kapillárist alkalmaztunk kapilláris elektrokromatográfia oszlopaként, melyet szuszpendált POROS® R2-10 típusú fordított fázisú, perfúziós kromatográfiás töltettel (Perseptive Biosystem, USA) nyomtunk tele (15 cm). A kapilláris hegyének belső átmérője 5-7 μm , így az visszatartotta a töltet 10 μm -es szemcséit. Az elválasztó kapillárist feltöltöttük a háttérektrólittal (metanol-víz-ecetsav, 20-79-1, v/v/v), majd bedugtuk a boroszilikát nanospray kapillárisba, ott rögzítettük, míg másik végét a háttérektrólitot és a platina ellenelektrodát tartalmazó edénybe merítettük (43. ábra). A CE-MS és CEC-MS analízisekhez a nanoESI túre 1,3 kV, míg a CE ellenelektrodra 15 kV feszültséget kapcsoltunk. Az elválasztandó peptidkeveréket (Ac-RGVGGLGLGK-NH₂, Ac-

RGAGGLGLGK-NH₂, Ac-RGGGGLGLGK-NH₂ és H-RGAGGLGLGK-NH₂) elektrokinetikus injektálással (-5 kV, 2-3 másodperc) juttattuk a kapillárisba.



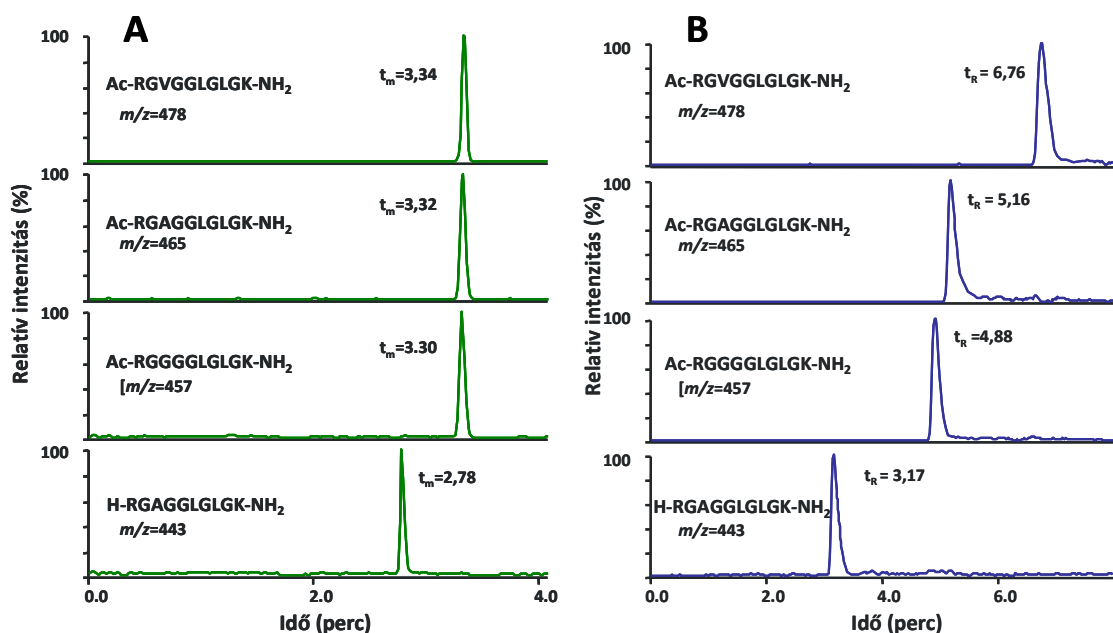
43. ábra

Kapilláris elektroforézis – tömegspektrométer kapcsolat kialakítása

Eredmények és megbeszélésük

A laboratóriumomban összeállított kapilláris elektroforézis-tömegspektrométer interface alkalmas volt CE-MS és CEC-MS analízisek kivitelezésére (44. ábra). Igaznak bizonyult a statikus nanoESI kifejlesztőjének leírása [126], hogy alacsony áramlási sebesség mellett egy-egy aranyozott elektropray kapilláris akár 45 percig képes volt stabil elektropray kialakítani. Ez az idő (mintától függően) elegendő néhány analízis kivitelezésére, majd a tű kicserélése után újabb futtatások végezhetők. CZE üzemmódban az acetilezett, csak egy aminosavban különböző peptidek egymástól nem, csak a szabad N-terminálisú homológtól lehetett elválasztani, míg CEC módban a POROS R2-10 töltet segítségével hidrofóbicitáskülönbségük alapján mindegyik peptid elvált egymástól. CEC módban a peptidek migrációs ideje hosszabb volt, mint a töltet nélküli CZE esetében, ami az peptid és az állófázis közötti kölcsönhatás kialakulására utal.

Amint azt korábban bemutattam, a szilárdfázisú peptidszintéssel előállított peptidek tisztítására csaknem kizárólag fordított fázisú nagyhatékonyságú kromatográfiát használnak, melynek során a leggyakrabban alkalmazott eluens a TFA-víz-acetonitril különböző összetételű elegye. A kromatográfia befejeztével a tiszta frakciókat összegyűjtik, majd liofilizálják. Így a peptidek csaknem mindig trifluoracetát formában vannak jelen. A TFA erősen kötődik a peptidhez, ami erősen bázikus peptid esetén megnehezíti annak azonosítását,



44. ábra

Hasonló szerkezetű peptidok analízise CE-MS (A) és CEC-MS (B) módszerrel

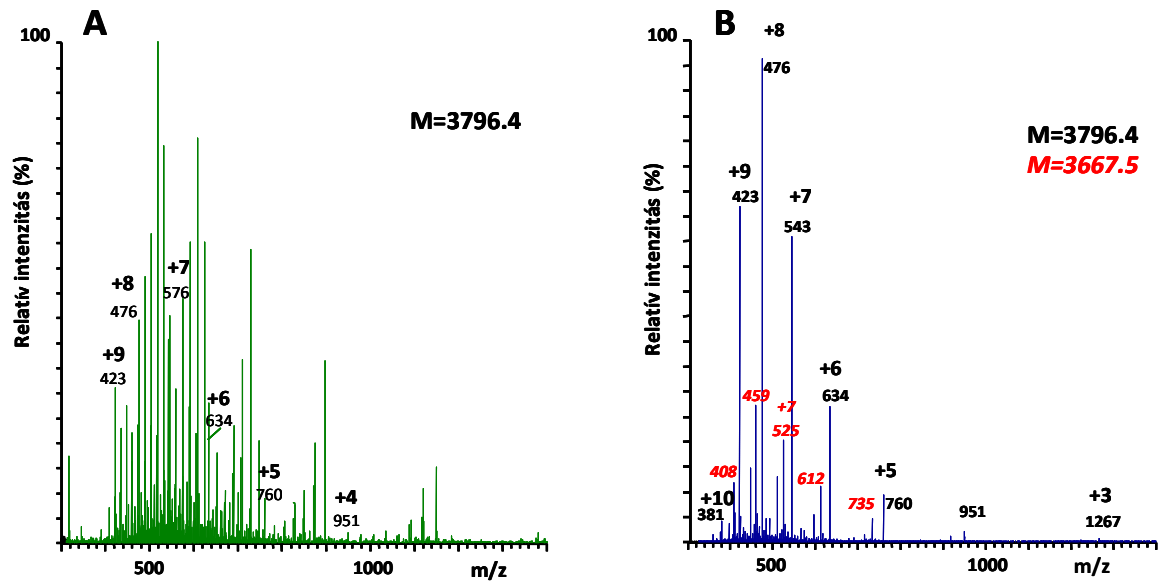
CE: 50 µm x 20 cm kvarc kapilláris, háttélektrolit: metanol-víz-ecetsav (20-79-1, v/v/v), 15 kV

CEC: 320 µm x 15 cm POROS R2-10 oszlop, háttélektrolit: metanol-víz-ecetsav (20-79-1, v/v/v), 15 kV

MS: nanoESI, 1500 V

amint az intézetünkben előállított VEPKVKKREAVAGRGRGRGRGRGRGR-GRGRGGPRR, 15 bázikus aminosavat tartalmazó peptid ESI-MS spektrumán látható (45/A. ábra). A peptid erősen poláris volta miatt CEC-MS rendszerben kis retenciával (1,8 perc) eluálódott a fordított fázisú POROS® R2-10 töltetről. Az elektrokratográfia során megszabadultunk az erősen kapcsolódó trifluoracetát anionoktól, s peptid könnyen értelmezhető, $[M+2H]^{2+}$ – $[M+10H]^{10+}$ ionsorozatot tartalmazó spektrumát kaptuk (45/B. ábra). A kitisztult spektrumból egy szennyezést is ki lehetett mutatni, amit az 3667,5 molekulatömegű ion 2-9-szeres töltésű ionjainak sorozatával bizonyítottunk. A szennyezés az egy Lys-nel kevesebbet tartalmazó deléciós peptiddel azonos.

A módszert átültettük HPLC-re (2 x 20 mm C18 oszlop), és azóta rendszeresen használjuk ESI-MS mérés előtt sok TFA-t tartalmazó peptidok on-line TFA-mentesítésére.



45. ábra

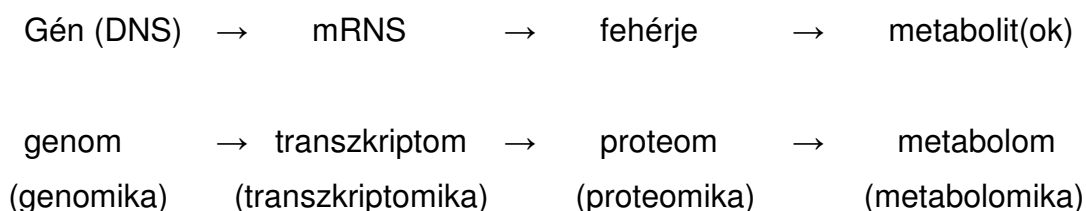
A VEPKVKKREAVAGRGRGRGRGRGRGRGRGGPRR peptid ESI-MS (A) és CEC-nanoESI-MS (B) analízise, ESI spray oldat metanol-víz-ecetsav (20-79-1, v/v/v), MS: 4000V, CEC: 320 μm x 15 cm POROS[®] R2-10 oszlop, háttérelektrolit: metanol-víz-ecetsav (20-79-1, v/v/v), 15 kV, MS: nanoESI, 1500 V

4. PROTEOMIKA

4.1. BEVEZETÉS

A proteomika a proteomot alkotó fehérjék átfogó minőségi és mennyiségi analízisével, valamint funkcióinak megismerésével foglalkozó tudományág. A proteomika és proteom kifejezéseket Marc Wilkins javasolta [192], amelyek tükör-szinonimái a genomikának és a genomnak, mely egy élő szervezet teljes génkészletét jelenti. A proteom („**protein complement of a genome**”) egy sejt, szövet, szerv vagy szervezet teljes fehérjeállományát jelenti egy adott időpontban. Az „omics/omika” kifejezés megjelenése szimbolizálja, hogy hogyan változott meg a gondolkodás az élő szervezet biológiájáról és működéséről. Az 1990-es évek közepéig a biokémikusok, biológusok, sejtbiológusok egy specifikus biokémiai folyamat egyedi génjeiben, fehérjeiben és a folyamathoz tartozó néhány metabolittal foglalkoztak és a rendelkezésre álló módszerekkel nagyon sok információt gyűjtöttek egy-egy folyamatról.

A géntérképezési eljárások automatizálásával az utóbbi lassan másfél évtizedben sok-sok organizmus genomja vált ismertté és ez maga után vonzotta több nagyléptékű -omikai tudományág, így a transzkriptomika, proteomika, metabolomika, lipidomika és a glikomika kialakulását, ill. nagyarányú fejlődését.



46. ábra
A biológia dogmája

Az információtechnológia óriási fejlődésének és a kereshető internetes adatbázisok megjelenésének köszönhetően hatalmas mennyiségű molekuláris információ vált elérhetővé, használhatóvá. A sok információ azonban csak adathalmaz marad, ha nem sikerül azokat valamilyen működési kapcsolatba, hálózatba, hierarchiába, azaz rendszerbe foglalni. Ezzel foglalkozik a rendszerbiológia.

A fehérjeexpresszióra sokáig a mRNS expresszióváltozásaiból próbáltak következtetni. A vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy az mRNS- és a fehérje-expresszió mértéke között meglehetősen kicsi a korreláció ($r^2 < 0,4$) [193], mert az mRNS nem mindig

íródik át fehérjévé. Ahhoz, hogy megértsük, mi is történik valójában a sejtekben, mindenképpen meg kell ismerni a sejtekben egy adott pillanatban jelenlévő fehérjék mennyiségét és aktivitását, kölcsönhatásait, valamint azok kritikus poszt-transzlációs módosításait, melyek szabályozzák a fehérjék aktivitását is. Mindezt el lehet végezni egyedi fehérjék, ill. a proteom szintjén a megfelelő fehérjekémiai, ill. proteomikai technológiák segítségével. A fehérjekémia a fehérjék szerkezetét és funkcióit vizsgálja, és leginkább a fizikai biokémia és enzimológia területén alkalmazzák. A munka során a szekvencia teljes meghatározására és a fehérjeszerkezet megismerésére törekednek; modellezéssel, ill. kísérletekkel a szerkezetnek a fehérje funkciójára gyakorolt hatását vizsgálják. Többnyire egy fehérjét, esetleg néhány alegységből álló komplexeket tanulmányoznak. Ezzel szemben a proteomika a multiprotein tartalmú rendszereket vizsgálja, fókuszálva a sok különálló fehérje kölcsönhatására és a nagyobb rendszerekben, hálózatokban betöltött szerepükre. Az analízis során komplex fehérjekeverékeket vizsgál, de nem törekszik teljes szekvenciameghatározásra, a fehérjéket részleges aminosavsorrend és adatbázisok segítségével azonosítja. A proteomika eredményeit a rendszerbiológia, a fehérjekémiaát a szerkezeti biológia hasznosítja. Más szóval a proteomika az egész proteomot vizsgálja és nem egy komponensének analízisére törekszik. (Ezért tárgyaltam bizonyos egyszerű fehérjeazonosításokat az előző fejezetben.)

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 érik el a kitűzött cél, szintén többféle proteomikáról beszélünk. Munkám során tömegspektrometria-alapú [194] és affinitási kölcsönhatás-alapú (fehérje-chip) [195] módszereket használtam.

A proteom analízisekor több nehézséggel nézünk szembe. A mintában lévő fehérjék széles molekulatömeg-tartományban (5000 – 1.000.000 Da), nagy koncentráció-különbséggel (sejtekben 10^6 , vérben 10^{10} is lehet az arány a különböző fehérjék koncentrációja között) és nagy számban (sejtekben 10^4 nagyságrend) fordulnak elő, ráadásul a proteom sem térben, sem időben nem állandó. Emiatt rendszerint több nagy felbontóképességű és nagy érzékenységgű módszert kell kombinálni a fehérjék vizsgálatához.

A tömegspektrometria-alapú proteomika lépései a következők:

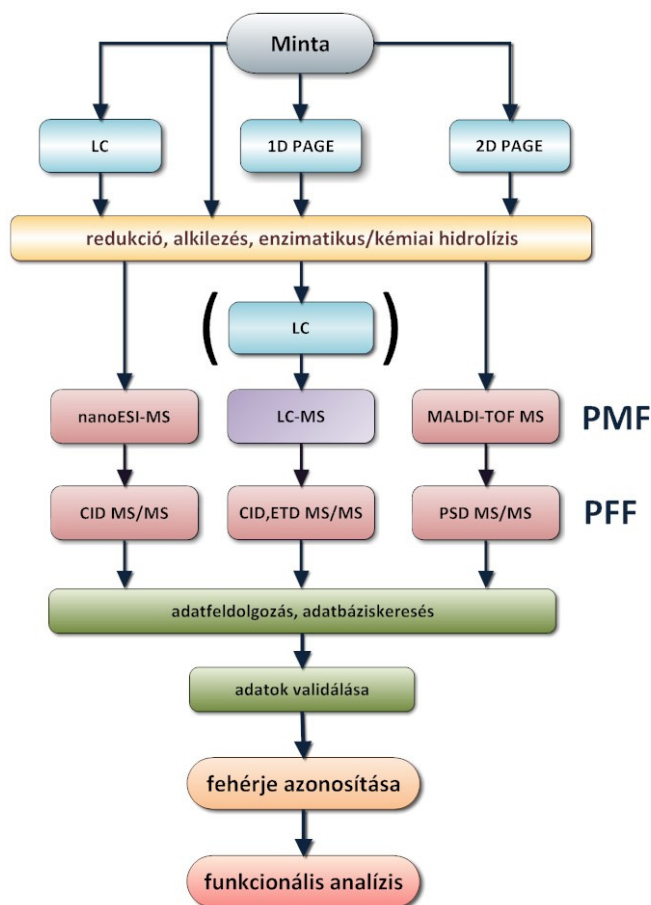
mintaelőkészítés → elválasztás → tömegspektrometriás minőségi és mennyiségi analízis →
bioinformatikai kiértékelés → validálás.

Minden proteomikai fehérjeazonosítás egy lényeges tényre épül: a legalább hat, vagy több aminosavat tartalmazó peptid szekvenciája nagyrészt egyedi egy organizmus proteomjában. Más szóval egy tipikus hexapeptid jellemez egy génterméket. Így ha meghatározzuk (MS/MS) a peptid(ek) szekvenciáját, adatbázisban történő kereséssel meg tudjuk mondani, hogy milyen fehérjéből származik. Természetesen ugyanolyan szekvenciával rendelkező hexapeptid több fehérjében is előfordulhat, azonban ezek rendszerint a hasonló fehérjék konzervált régióiból származnak. Kettő vagy több peptid szekvenciájának meghatározásával nagy biztonsággal azonosítható a fehérje. Minden (legtöbb) fehérje egyedi, így hidrolízistermékeinek összessége is jellemző lesz az adott fehérjére. A fragmensek pontos tömegének megmérésevel („peptide mass fingerprinting”, PMF, „peptid tömeg térképezés”) szintén következtetni lehet a fehérjére [196]. Természetesen itt is igaz, hogy egy-két peptid szekvenciájának megismerése jelentősen megnöveli a fehérjeazonosítás valószínűségének biztonságát. A fentiek alapján a proteomikai fehérjeazonosítás lényege, hogy a fehérjét peptidekké bontjuk, majd ezek tömegének/szekvenciájának meghatározásával adatbázisokban történő egyeztetés alapján következtetünk az eredeti fehérjére.

A biológiai minták rendkívüli összetettsége miatt a fehérjét először ki kell nyerni az őket körülvevő biológiai mátrixból. A minta típusától függően ez történhet különböző feltárási, kicsapási módszerekkel, ultraszűrőssel, centrifugálással, szilárdfázisú extrakcióval stb. [197]. A kapott fehérjekeverék rendszerint még nagyon sok komponenst tartalmaz, ezért a tömegspektrometriás analízis előtt csökkenteni kell annak komplexitását. Ez rendszerint kromatográfiás és/vagy elektroforetikus elválasztási módszerekkel történik. A választott elválasztástechnikai eljárás függ attól, hogy a proteomikai analízis melyik szakaszában és milyen céllal használják. Nagyon gyakori, hogy az analizálandó minta még mindig sokfajta komponenst tartalmaz, ekkor egy második, ortogonális elválasztási módszer alkalmazásával (vagy ultra nagy felbontású tömegspektrométerrel) érhetünk célt. Az elválasztás mindig a peptidek/fehérjék valamilyen fizikai-kémiai tulajdonságán alapul, amit az aminosavösszetétel és az esetleges poszttranszlációs módosítások határoznak meg.

Az 47. ábrán bemutatom a tömegspektrometriás fehérjeazonosítás folyamatábráját. Látható, hogy a folyamat több lépésében alkalmaz(hat)tunk elválasztástechnikai eljárást. A fehérjék elválasztására használt kromatográfiás módszerek (géliszűrés, ioncserés, hidrofób kölcsönhatási, fordított fázisú) nem elég hatékonyak, szelektívek (kivéve az affinitási kromatográfiát), ezért többnyire a mintaelőkészítési lépésben kerülnek alkalmazásra. A fehérjéből proteolízissel kapott peptideket a proteomikában csaknem kizárólag fordított fázisú, C-18 állófázison választják szét, közvetlenül a tömegspektrometriás analízis előtt. (A

„MudPIT” (**M**ultidimensional **P**rotein **I**dentification **T**echnology) eljárásban a fehérjekeverék enzimatiskus proteolízisét követően a kapott nagyszámú peptidet on-line kétdimenziós folyadékkromatográfiával (első dimenzió: ioncsere, második dimenzió: RP-HPLC) választják szét, majd MS/MS módszerrel analizálják [198]). Az érzékenység és a hatékonyság növelése érdekében a már bemutatott nano-, ill. kapilláris kromatográfiás rendszereket kapcsolnak on-line a tömegspektrométerhez.



47. ábra

A proteomikai fehérjeazonosítás folyamatábrája

Fehérjék bioanalitikai vizsgálatára, elválasztására legelterjedtebb módszer az egy dimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (1D-PAGE), melynek első lépése a fehérjék redukálása (merkaptotanol, ditiotritol) és denaturálása (nátrium dodecilszulfát, SDS) [199]. Az elválasztás alapja, hogy az SDS molekulák hozzátapadva a fehérjeláncokhoz, a molekulatömeggel közel arányos negatív töltést adnak (dodecilszulfát anion) a fehérjéknek. Az így előkezelt elegyet nagyfeszültségű elektroforézisnek alávetve a fehérje-SDS komplexek a keresztkötött poliakrilamid gélben az anód felé vándorolnak. A vándorlás sebessége arányos

a komplexnek a gélmátrix pórusaiba való belépési képességével. A kisebb molekulatömegű fehérjék gyorsabban, a nagyobbak lassabban mozgó sávokba rendeződnek, amelyeket különböző festési eljárásokkal (Coomassie Brilliant Blue R-250, G-250, Amido-black, ezüstözés, imidazol/cink stb.) lehet láthatóvá tenni. A gél sűrűségét, viszkozitását és pórusméretét az akrilamid és a bisz-akrilamid koncentráció határozza meg. Az 1D-PAGE felbontása teljes proteom vizsgálatára nem megfelelő (egy-egy sávban 10-100 fehérje is lehet), ezért a proteomikában csak akkor használjuk, ha a vizsgálandó fehérjekeverék nem túlzottan komplex.

A proteomikában a legelterjedtebb fehérjeelválasztási módszer a 2D-PAGE, melyet először O'Farrel [200] és Klose [201] alkalmaztak proteom vizsgálatára. A kétdimenziós elválasztási módszerek elválasztóképessége (csúcs/folt-kapacitás) közelítőleg egyenlő az egyes alkalmazott módszerek elválasztóképességének szorzatával [202]. 2D elektroforézissel a gél nagyságától és a festési módszer érzékenységétől függően 1000 – 10000 foltot lehet megkülönböztetni, ami egy sejtben lévő fehérjék számának 7-24 %-a. Így a 2D PAGE-vel csak a nagyobb koncentrációban jelenlévő fehérjéket lehet detektálni, $\frac{3}{4}$ részük láthatatlan marad [203]. (Tömegspektrometriás analízissel ez az arány növekszik, mert egy-egy foltban több fehérjét is lehet azonosítani [204].) Az elválasztás első fázisában a fehérjéket amfolitokkal előállított vagy immobilizált pH gradiensben fókuszálják, melynek során az egyes komponensek izoelektromos pontjuknak megfelelő pH érték körül gyűlnek össze (IEF, izoelektromos fókuszálás), aszerint válnak szét. Kezdetben az IEF-et géllal töltött csőben hajtották végre. Jelentősen megnövelte a módszer reprodukálhatóságát a rögzített pH-gradienst tartalmazó, kontrollált körülmények között előállított gyári gélcsíkok használata [205]. A legáltalánosabban használt pH 3-10 gradiens mellett nagyobb felbontás elérése érdekében szűkített pH intervallumú (3-6, 5-8, 7-10, ill. még szűkebb) csíkok is elérhetők [206]. Az izoelektromos fókuszálás denaturáló közegben (urea, tiourea, CHAPS detergens) történik. Redukálószer (ditiotritol, ditioueritritol) hozzáadására a diszulfidhidak felhasadnak, ami szintén hozzájárul a fehérjék denaturációjához. A ciszteinek újbóli összekapcsolódását az IEF végén az –SH csoportok alkilezésével (jódacetamid) akadályozzák meg. A második dimenzióban az elválasztás az elsővel ortogonális módszerrel, a molekulatömeg alapján elválasztó SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel történik. Proteomikai célra leggyakrabban 1 mm vastag 24 x 20 cm-es géleket alkalmaznak, de a minta komplexitásától függően akár kisebb (8 x 8 cm, 17 x 17 cm), akár nagyobb (40 x 30 cm) gélek is használhatók. Egy 24 x 20 cm-es gélen akár 1 mg fehérjekeverék is jól analizálható és a foltokban lévő fehérjék mennyisége többnyire elég a tömegspektrometriás fehérjeazonosításhoz. Az elválasztott

fehérjéket különböző típusú és érzékenységgű festési eljárásokkal lehet láthatóvá tenni. Fehérjék összehasonlító expressziós elemzéséhez olyan festéket célszerű választani, amelyik a fehérje mennyiségével arányos jelet ad. Ilyenek a fluoreszcens Cy festékek, a SYPRO Ruby, Deep Purple, RuBPs és többé-kevésbe a Coomassie Brilliant Blue R-250, G-250.

A 2D-PAGE minden korlátja ellenére (nagy molekulatömegű, hidrofób fehérjék, erősen bázikus fehérjék nem elemezhetők, csak a nagyobb mennyiségű fehérjéket detektálja stb.) proteomikában fehérjék elválasztására ma is a legáltalánosabban használt módszer.

Két biológiai minta fehérjeprofiliójának megbízható összehasonlításához (expressziós proteomika) nélkülözhetetlen a 2D-PAGE reprodukálhatósága. Ez függ a kivitelezés körülményeitől, de elsősorban a kivitelező ügyességétől (variációs koefficiens 10-25%) [207]. Az összehasonlíthatóság növelése érdekében dolgozták ki a 2D fluoreszcens differenciális gélelektroforézist (2D DIGE) [208]. A módszer lényege az, hogy a két minta, ill. 1:1 arányú elegyének (referencia) fehérjéit elektroforézis előtt eltérő tulajdonságú, fluoreszcens cianin festékekkel (Cy3, Cy5, Cy2) kovalensen megjelölik, majd összekeverik. A két minta azonos fehérjei azonos foltba vándorolnak, így nem lesz eltérés a két minta fehérjeinek koordinátái között. Az egyes fluoreszcens festékek hullámhosszán detektálva három denzitogramot kapunk, melyek pontosan illeszkednek egymásra. Az azonos foltok intenzitásainak összevetésével lehet következtetni mennyiségi viszonyaira. Fluoreszcens festékek alkalmazása javítja az érzékenységet (< 1 ng), míg a Cy2 festékkel jelzett referenciaminta használata növeli a módszer reprodukálhatóságát (5-8%) [209].

Az ún. „bottom-up” proteomikai analízisben (peptidek szerkezetéből következtetünk a fehérjére) a denaturált fehérjéket enzimatis vagy kémiai módszerekkel peptidekké bontjuk. Ehhez olyan reagenst kell választani, ami specifikusan mindig ugyanazon az egy vagy két aminosav előtt vagy után hasítja el a peptidkötést. Ilyen enzimek a tripszin (K, R), endoproteináz Lys-C (K), Arg-C (R), Glu-C (E, D), kimotripszin (F, Y, W) stb. A bázikus aminosavak C-terminálisán hasító enzimek azért különösen alkalmasak a proteomikai fehérjeazonosításában, mert a képződő peptidek mindegyike bázikus aminosavat tartalmaz a peptidlánc végén, ahol a tömegspektrometriás ionizáció során a pozitív töltés lokalizálódhat.

Az előző fejezetben bemutattam azokat a tömegspektrometriás ionizálási módszereket és analizátorokat, amelyek alkalmasak peptidek minőségi és mennyiségi meghatározására, így a proteomikában is az ESI és MALDI ionforrással felszerelt tömegspektrométerek használatosak. Ismételt hangsúlyozom, hogy a peptid és fehérjeanalitika és ennek következtében a proteomika sem jutott volna el mostani szintjére a tömegspektrometria utóbbi másfél évtizedben történt rendkívüli fejlődése nélkül. Ennek ellenére ma sincs olyan

tömegspektrométer (és talán nem is várható), ami mindenfajta proteomikai feladatra (nagy pontosságú tömegmérés, szekvenciameghatározás, poszttranszlációs változások kimutatása, mennyiségi analízis stb.) egyformán jó lenne.

A proteomika harmadik alappillére a bioinformatika, ill. a biostatisztika. A bioinformatika interdiszciplináris tudomány, amely matematikai, statisztikai és informatikai módszerekkel segíti biológiai, biokémiai és biofizikai problémák megoldását.

A DNS- és fehérjeszekvenálási módszerek elterjedésével szinte egy időben lépett fel az igény az adatokat összegyűjtő és számítógépes elemzéseket lehetővé tevő elektronikus adatbázisok létrehozására. A genomikai projektek és a proteomikai kutatások eredményei további óriási, naponta növekvő mennyiségű adatot szolgáltatnak és ezek kezelésére ma már kifinomult bioinformatikai eljárások és minden kutató számára elérhető internetes adatbázisok állnak rendelkezésre. Ezek egyrészt nukleinsavszekvencia adatbázisok (EMBL, GenBank, DDBJ), másrészt fehérjeszekvencia adatbázisok (PIR, SwissProt, NCBI, UniProt, TrEMBL), melyek felhasználhatók a tömegspektrometriás proteomikai mérési eredményekből történő fehérjeazonosításra [210]. A fehérjék azonosítása peptidjeik MS és/vagy MS/MS spektrumai alapján történik [211]. A különböző „kereső-motor” szoftverek (legismertebbek: MASCOT, Protein Prospector, Phenix, ProteinLynx Global Server, Spectrum Mill, ProFound stb.) *in silico* összehasonlítják a mért MS vagy MS/MS spektrumokat az adatbázisok összes fehérjéjéből származtatott peptidek elméleti spektrumaival. Ezután a mért spektrum(ok)hoz legjobban hasonlító spektrumú peptideket tartalmazó fehérjét egy pontozási rendszer alapján (scoring algorithm) sorbaállítják. Amennyiben egy vagy több fehérje pontszáma elér egy szigorú követelményekkel megállapított küszöbértéket, akkor azt/azokat azonosítottnak tekintik. Több, különböző algoritmussal működő „keresőmotor” alkalmazása megnöveli a fehérje azonosításának biztonságát. A különböző „keresőmotorok” más-más pontozási algoritmust használnak, ezért minden kiértékelésnél feltüntettem az alkalmazott szoftvert. A „peptid tömeg térképezés” (PMF) készítésekor a minta MS spektrumát [212], míg a „peptid fragmens térképezés” („peptide fragment fingerprinting”, PFF) készítésekor MS/MS spektrumát (spektrumait) hasonlítják az adatbázis összes fehérjéjének *in silico*, hasonló körülmények között (enzim, alkilezőszer) készült MS spektrumához, ill. a hasonló típusú (ionsapda, hármas kvadрупól, TOF, orbitrap stb.) készüléken felvett MS/MS spektrumaihoz [213]. Mára a „peptid tömeg térképezés” módszer használata háttérbe szorult, ill. csak segédeszközüül szolgál a „peptid fragmens térképezés” alapján történő fehérjeazonosításhoz. A tömegspektrometriás fehérjeazonosítás végére megismerhető az adatbázisokban szereplő

fehérjék neve, kódja, génje, szekvenciája, molekulatömege, izoelektromos pontja, poszt-transzlációs módosításai, kölcsönhatásai más fehérjékkel stb.

Az alapvető életfolyamatok molekuláris szintű megértéséhez, a rendszerbiológia kiteljesüléséhez szolgáltatott alapkutatási eredményeken túl a proteomika biomarkerek felfedezésével segítséget nyújthat a betegségek korai diagnózisában, betegségek előrehaladásának megismerésében, gyógyszeres terápia hatásának nyomonkövetésében, a gyógyszerkutatás különböző fázisaiban, környezetvédelmi problémák megoldásában, a növényélettani folyamatok megismerésével mezőgazdasági terméseredmények fokozásában stb.

4.2. CÉLKITŰZÉSEK

- A., Proteomikai alapkutatási céllal kísérlettervezési és módszerfejlesztési vizsgálatokat szerveztünk. Meg kívántuk határozni, hogy vajon a neuroproteomikai célú állatkísérletekben az állatok genetikai hátterének van-e befolyása az agy fehérjeösszetételére?
- B., Az 1D és 2D poliakrilamid-gélelektroforézissel elválasztott fehérjék mennyiségi meghatározása nem megoldott. A „label-free” tömegspektrometriás módszer olyan továbbfejlesztését terveztük, amely lehetőséget teremt a gélben elválasztott fehérjék relatív és abszolút mennyiségének kvantitatív analízisére.
- C., Gabonafélék magjának fehérjeprofíl-vizsgálatával meg kívántuk határozni, hogy különböző biotikus és abiotikus stresszek hatására milyen stresszfehérjék képződnek, mert ezen fehérjék jelentős része emberekben allergiát (lisztérzékenység, gabonaallergia). Meg kívántuk vizsgálni, hogy ezek az allergén fehérjék a búzán kívül más gabonafélékben, ill. pszeudocereáliákban is megtalálhatók-e?
- D., A fehérjék a sejtekben lejártszódó biokémiai folyamatok állandó résztvevői. A különböző életfolyamatokban résztvevő összes fehérje funkciója, ill. szerveződése nem ismertek. Ezért célul tűztük ki humán placentából izolált fehérjék és kölcsönható partnereik proteomikai azonosítását, majd biológiai funkcióinak felderítését.

A riboszómális Rli1-fehérjével kölcsönható partnerek proteomikai azonosításával, majd biokémiai vizsgálatokkal meg akartuk határozni, hogy milyen funkciói vannak e fehérjének és miért nélkülözhetetlen a mitokondrium az eukarióta sejtek számára.

Egy sokat tanulmányozott életfolyamat, a hideg elleni védekezés mögött rejlő biokémiai folyamatok felderítéséhez terveztük a hidegstressznek kitett, majd reakklimatizált állatok barna zsírszövetében történt fehérjeváltozások kimutatását, ill., a megváltozott expressziójú fehérjék hatására bekövetkező életfolyamatok vizsgálatát.

A programozott sejthalál folyamatában fontos szerepet játszik a transzglutamináz enzim. Célkitűzésünk volt azon fehérje felderítése, amely *Caenorhabditis elegans* fonalféregben (a sejthalál vizsgálatának modellállata) az enzim szubsztrátjaként működik.

- E., A gyógyszerek célpontjai a legtöbb esetben fehérjék. E célpontok felderítésére egyik alkalmas módszer a proteomika. Így betegségek állatmodelljeinek proteomikai vizsgálatával, a megváltozott expressziójú fehérjékből következtetni lehet a betegség által érintett biokémiai folyamatokról, melyekbe megfelelő gyógyszerek tervezésével be lehet avatkozni. A szorongás egy új állatmodelljében a kísérleti állatok agyának proteomikai vizsgálatával meg kívántuk határozni azokat a folyamatokat, amelyek részt vesznek a betegség kialakulásában.

Kissejtes tüdőkarcinóma sejtenyészetén, ill. *in vivo* hatékony peptidszármazékok kölcsönható partnereinek proteomikai azonosításával meg akartuk határozni azon molekuláris célpontokat, amelyeken keresztül hatásukat kifejtik.

A gyógyszerkutatáshoz tartozik a gyógyszerek mellékhatásainak vizsgálata, magyarázata is. Ennek érdekében választ kerestünk arra, hogy a nukleozid analógokkal (HIV gyógyszerek) történő gyógykezelés miért és hogyan vezethet kardiomiopátia kialakulásához.

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

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

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

4.3. KÍSÉRLETTERVEZÉSI ÉS MÓDSZERFEJLESZTÉSI VIZSGÁLATOK

4.3.1. A biológiai és technikai variancia vizsgálata [XXXII]

A biológiai, élettani, orvosi és farmakológiai kutatások végeredményének minőségét elsősorban két tényező: a választott állatmodell tulajdonságai (biológiai variancia) és a kísérlet kivitelezésének minősége (technikai variancia) határozzák meg [207]. A felmerült tudományos kérdések állatkísérletes megválaszolásában alapvető szerepe van a megfelelő állatmodell kiválasztásának, ill. annak, hogy a kísérleti állatok genetikai jellemzői megfeleljenek a kísérlet célkitűzéseinek. Genetikai tényezők határozzák meg az állatok tulajdonságait, beleértve a különböző fizikai hatásokkal, kémiai anyagokkal, kórokozó mikrobákkal és idegen, illetve saját antigénekkal szembeni érzékenységet. A genetikai tulajdonságok befolyásolják a kóros elváltozásokra, a betegségekre való hajlamot, de a kezelés hatékonyságát és mellékhatásait is. Természetesen nem csak a reakció kiválthatóságát, hanem annak mértékét is befolyásolják a genetikai tényezők [214]. Ezek a tényezők együttesen határozzák meg azt, hogy egy-egy állatfaj, törzs alkalmas vagy nem egy adott kísérlethez.

A 2D-elektroforézis ma is a legszélesebb körben használt proteomikai módszer egy külső vagy belső hatásra bekövetkező fehérje expresszió-változások kvantitatív meghatározására [215]. Történetének 36 éve alatt nagyon sokat fejlesztettek az eljárásról, de ennek ellenére még ma is rendkívül munkaigényes, nem automatizált és bizonyos fókuszban szubjektív módszer maradt [216].

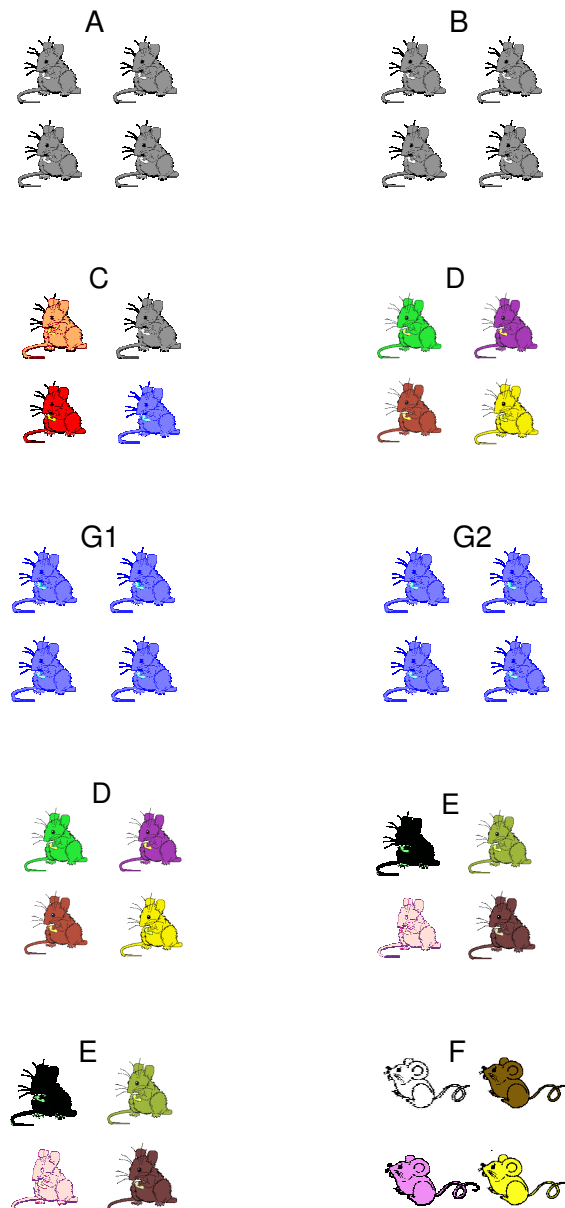
A biológiai kísérleteknek már a tervezési fázisában figyelembe kell venni a biológiai és technikai varianciák nagyságát és eredetét. A biológiai variancia elsősorban az állatmodell genetikai háttérétől és tartási körülményeitől, míg a technikai variancia a mintaelőkészítéstől, az elektroforézis, festés és a kiértékelés lépéseitől függ. A két kísérleti állatcsoport eredményei közötti ún. totál variancia a biológiai és technikai varianciák összege.

Kutatócsoportommal arra kerestük a választ, hogy az egerek genetikai háttere hogyan befolyásolja agyi proteomjuk összetételét, ill. milyen minőségi paramétereket kell elérni a 2D analízis során, hogy megbízható eredményeket kapjunk a fehérjeexpresszió változására.

Kísérletek

A kísérletekhez azonos vagy különböző almokból származó 30-40 grammos hím NMRI egereket, ill. külön alomból származó C3H/HEN egereket használtunk a 48. ábrán

látható kísérleti elrendezésben. A 60 ± 2 napos állatok agyát kivettük, majd a jobb féltekét homogenizálva a proteomot 2D-PAGE-val analizáltuk.



48. ábra

1. kísérlet: A és B csoportok egy anyától (testvérek)
2. kísérlet: C és D csoportok mindegyike más anyától
3. kísérlet: G1 és G2 csoportok azonos szülőktől két generáció (köztük 2 hónap)
4. kísérlet: D és E csoportok mindegyike más szülőktől (köztük 2 hónap)
5. kísérlet: E csoport NMRI egér, F csoport C3H/HEN egér

A biológiai variancia meghatározása érdekében az állatokból származó mintákat külön-külön dolgoztuk fel. A technikai varianciát két alkalommal, ugyanannak a mintának 4 párhuzamos mérésével határoztuk meg. A fehérjeprofílok összehasonlítását a gélek digitalizálása után

(FLA-5100 szkennel, FUJI-FILM) a Progenesis SameSpots szoftverrel (NonLinear Dynamics, USA) hasonlítottuk össze. Az egyszerű statisztikai értékelésen túl adatainkat szigorú szűrésnek vetettük alá (FDR, „false discovery rate”) [217], majd a statisztikai próba erejét a Piface szoftverrel analizáltuk [218].

Eredmények és megbeszélésük

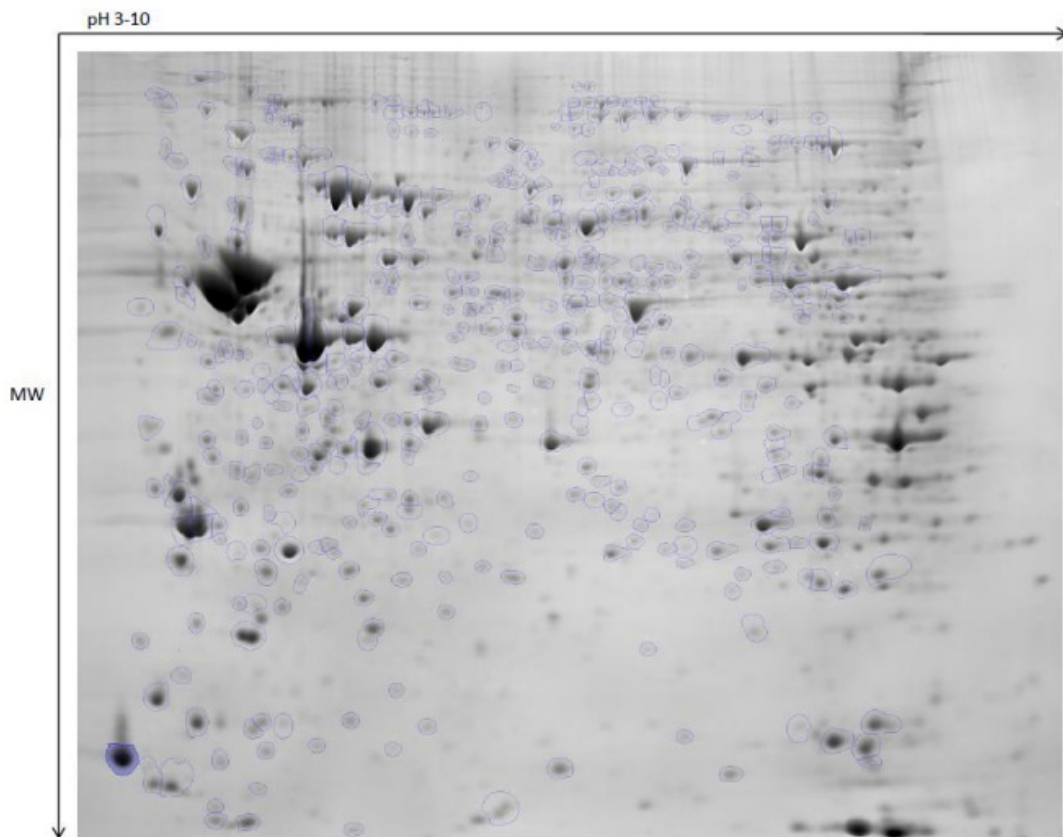
Minden kísérletes tudományban nélkülözhetetlen előkísérletek végzése, amik segítenek megérteni és csökkenteni azokat a hatásokat, változókat, hibákat, amelyekről az eredmény függ. Egy kísérlet teljes varianciája a biológiai és a technikai varianciák összege. Egy állatmodell egyedeinek genetikai háttere jelentősen befolyásolhatja a biológiai varianciát. Az NMRI egértörzs a farmakológiai, toxikológiai, immunológiai kutatásban általánosan használt, genetikailag nem definiált, ún. „kültényesztett” törzs. Úgy gondoltuk, hogy az egy alomból származó utódok homogénebb genetikai háttérrel, kisebb biológiai varianciával rendelkeznek, mint a különböző anyától származók, ezért érzékenyebben lehet a kisebb fehérjeexpresszió-változásokat detektálni.

Az 49. ábrán bemutatok a kísérletre jellemző 2D elválasztás elektroferogramját. A 2D-PAGE technikai ismételhetőségét, a technikai varianciát egy egéragy homogenizátumának 2 x 4 párhuzamos analízisével határoztuk meg. A két sorozatban a medián CV%-t 9,3%-nak találtuk (sőt a pontok 95%-ának variációs koefficiense is kisebb, mint 20,5%), ami jobb, mint a hasonló poszt-elektroforetikus festett gélek esetében mért 16,2% [219], de gyengébb, mint a 2D-DIGE kísérletben mért 7% [209]. Ez a kiváló eredmény részben a legkorszerűbb kiértékelő szoftver, a SameSpot folt-kezelő algoritmusának tulajdonítható. Azt találtuk, hogy a kisebb foltoknak nagyobb a variációs koefficiense, mint a nagyobbaké. Az azonos és különböző almokból származó állatokkal végzett vizsgálatokban a totál variancia 12,1%-nak, ill. 11,2%-nak adódott, ami a technikai varianciánál 20-30%-kal magasabb (50. ábra). Ez a kis különbség arra utal, hogy kísérletünkben a biológiai variancia kicsi, és az egy kísérletben belüli totál varianciát a technikai ismételhetőség fogja döntően befolyásolni.

Az eredmények statisztikai értékelésével következtetéseket lehet levonni arra vonatkozólag, hogy egy-egy csoportban milyen állatszám szükséges ahhoz, hogy bizonyos szintű fehérjeexpresszió-különbséget detektálni tudjunk. Általánosan elfogadott, hogy két folt intenzitását akkor tekintjük szignifikánsan különbözőnek, ha a $p < 0,05$ és a statisztikai próba ereje (power) nagyobb, mint 0,8. Kísérleti körülményeink mellett a négyes elemszám minimum kétszeres változás (100%) detektálására van lehetőség. Ha kisebb különbségeket (pl. 50%-os) is detektálni szeretnénk, az állatszámot legalább kilencre kellene növelni. A 2D-

dc_272_11

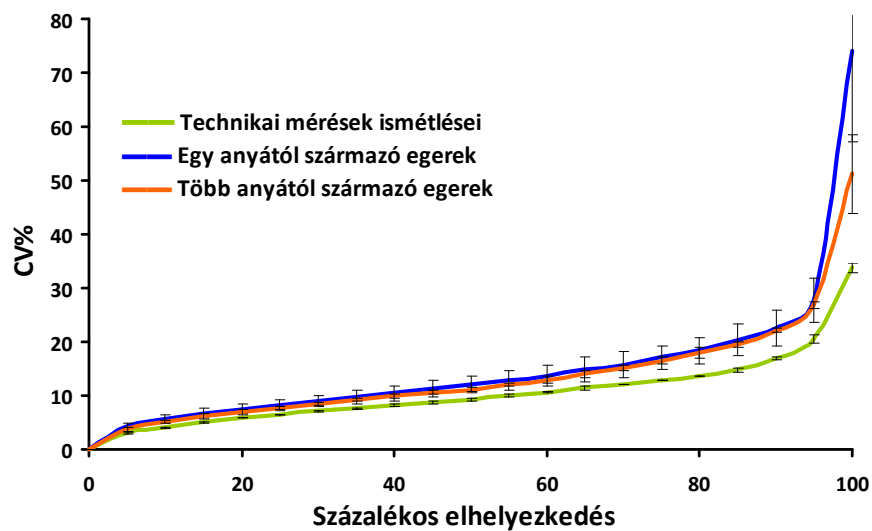
DIGE módszer előnye itt nyilvánul meg, mert a kisebb technikai variancia miatt kezelhető állatszám mellett kisebb különbségeket is lehet megbízhatóan értékelni [220].



49. ábra

NMRI egér agyának 2D-PAGE elektroferogramja

IEF: 24 cm pH 3-10 IPG csík, SDS-PAGE: 24 x 20 cm gradiens gél (10-14,5%), festés RuBPs
A kékekkel körülrajzolt foltok az összes gélen statisztikailag jól detektálható foltokat jelzik.



50. ábra

A variációs koefficiens megoszlása technikai és biológiai párhuzamos mérések esetén

Az előző számításokkal szemben, amikor az összes (36 db) NMRI egéragegyéből készített gélek azonos feltjait vettük figyelembe, csoportonkénti összehasonlításokat is végeztünk (4. táblázat).

4. táblázat

Egy és több alomból származó NMRI és C3H/HEN egerek agyi proteomjának összehasonlítása

	1. kísérlet	2. kísérlet	3. kísérlet	4. kísérlet	5. kísérlet
Foltok száma*	782	733	830	689	593
CV%	CV% _A = 13,4	CV% _C = 13,1	CV% _{G1} = 15,3	CV% _D = 12,7	CV% _E = 11,5
	CV% _B = 12,8	CV% _D = 12,8			
	CV% _{A,B} = 14,4	CV% _{C,D} = 14,9	CV% _{G2} = 10,8	CV% _E = 11,8	CV% _F = 12,9
r^2	0,988	0,991	0,987	0,990	0,978
FDR-korrigált p < 0,05	0	0	1,9% (16)	2,2% (15)	15,5% (92)
Változás ≥ 2	0	0	0,2% (2)	0	1,9% (11)

* 100%-ban egyező foltok száma

Az azonos anyától származó 8 egér két csoportja között nem találtunk egy fehérjefoltot sem, melynek intenzitása szignifikánsan különböző lett volna (1. kísérlet). Ugyanez mondható el arról a két állatcsoportról, melyekben az egerek véletlenszerűen, különböző anyaktól lettek összeválogatva (2. kísérlet). Az eredmény teljesen összecseng az előző eredménnyel, miszerint a kísérletekhez felhasznált NMRI egerek ugyan „kültényesztett” állatok, mégis homogén populációt képeznek (az egy anyától származás nem javít rajta). Hasonló képet kaptunk a 3. és 4. kísérlet összehasonlításakor, melyekben a két-két összehasonlított állatcsoport leölése között 2 hónap telt el és az egy anyától való származás itt sem bizonyult különösebben előnyösnek. Jelentős eltérést kaptunk azonban a két fajta egértörzs (NMRI és C3H/HEN) agyi proteomja között: 92 szignifikánsan különböző intenzitású folt közül 11 kétszeresnél nagyobb különbséget mutatott.

Összefoglalásként elmondható, hogy megfelelő szakértelemmel és gondossággal a 2D-gélelektroforézissel kiváló, 9,3% (CV%) reprodukálhatóságú kísérleteket lehet végezni. Akár a genetikailag nem definiált „outbred” NMRI egércsoportokat, akár a genetikailag definiált „inbred” C3H/HEN csoportokat vizsgáltuk, a csoportok agyi fehérjeprofilja egységesnek bizonyult, a totál variancia 10,8 és 15,5% között változott. Ezért a klasszikus kísérleti állatcsoport-kialakítás (az állatok véletlenszerű csoportosítás) proteomikai kísérletekben is alkalmazható. A kísérletekből kiderült, hogy az egész kísérleten keresztül a technikai variancia dominál, míg a biológiai variancia ezen állattörzsekben nem jelentős. Az n = 4

állatszám szigorú statisztikai feltételek mellett minimum kétszeres változás meghatározására alkalmas. Eredményeink más laboratóriumok kísérlettervezéséhez is segítséget nyújthatnak.

4.3.2. Gélben elválasztott fehérjék mennyiségi meghatározása [XXXIII]

Fehérjekeverékek összetételének mennyiségi meghatározására leggyakrabban 1D- és 2D-gélelektroforetikus, ill. izotópos jelöléssel (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O) vagy jelölés nélkül („label-free”) működő LC-MS és LC-MS/MS tömegspektrometriás eljárásokat használnak [221]. Az expressziós proteomika legelterjedtebb módszere a fehérjék mennyiségi változásainak összehasonlítására a 2D-PAGE. Egy-egy biológiai mintában több 10000, de akár 100000 különböző fehérje is lehet, azonban a legnagyobb 2D-gélen ennek csak töredéke, a legnagyobb mennyiségben jelenlévő fehérjék láthatók. A többi fehérje mennyisége a detektálás érzékenységi szintje alatt van, vagy egy látható foltban több fehérje is található [222, 223]. A közel azonos izoelektromos ponttal és molekulatömeggel rendelkező fehérjék foltjai átfedik egymást. A kevésbé összetett minták 1D analízisekor hasonló problémával állunk szemben: ha a festés során két minta azonos molekulatömegű sávjai között intenzitáskülönbséget találunk, a mennyiségi eltérést nem lehet konkrétan egy fehérjéhez hozzárendelni. A probléma megoldására Havlis és mtsai [224] próbáltak először tömegspektrometriás módszert használni: izotóppal jelzett belső standard peptidek alkalmazásával meghatározták a gélben lévő fehérjék abszolút mennyiségét. Módszerük azonban korlátozottan és csak néhány előre kiválasztott fehérjére volt használható. Broedel és mtsai [223] az „in-gel” proteolízis során a párhuzamos mintákba beépített ^{16}O vagy ^{18}O izotóp arányából következtettek a két sávban lévő azonos fehérjék mennyiségére. Módszerük az izotópos jelölés bizonytalansága, ill. költsége miatt nem alkalmas nagy sorozatú mérésekhez. Céloom egy izotópos jelzést nem alkalmazó „label-free” tömegspektrometriás módszer kidolgozása volt, amely általánosan használható 1D és 2D sávokban/foltokban lévő fehérjék relatív és abszolút mennyiségeinek meghatározására. Módszerfejlesztésünk kiindulópontja Silva és mtsai közleménye volt [225], akik egy 6 fehérjéből álló keveréket oldatban hidrolizáltak, majd LC-MS^E módszerrel analizáltak. Az MS^E a Waters cég (Waters Corp., USA) Q-TOF tömegspektrométerén megvalósítható adatgyűjtési mód, mely alkalmas fehérjék egyidejű minőségi és mennyiségi analízisére [225].

Kísérletek

Az egy sávba/foltba vándorló fehérjék modellezésére elkészítettünk négy különböző összetételű oldatot, melyekben 5 ismert fehérjét kevertünk össze előre meghatározott arányban (A, B, C, D, E) (5. táblázat). A marha szérum albumint belső standardnak szántuk, ezért minden oldat azonos mennyiséget tartalmazott.

5. táblázat
Fehérjekeverékek összetétele (µg)

Fehérje	Molekulatömeg (Da)	pI	A	B	C	D
Alkohol-dehidrogenáz I	36692	6,3	0,1	1,0	0,5	0,25
Szénsav-anhidráz II	28983	6,4	1,0	0,5	0,25	0,1
Enoláz 1	46671	6,2	0,5	0,25	0,1	1,0
Ovalbumin	42750	5,2	0,25	0,1	1,0	0,25
Marha szérum albumin	66433	5,6	0,25	0,25	0,25	0,25

Ahhoz, hogy az öt fehérje egy gélcsávban legyen, a keveréket 12% poliakrilamid gélben (1D) rövid ideig (5 perc) elektroforizáltuk. A fehérjék még éppen csak beléptek a gélbe egy gélcsávot alkotva. A 2D-PAGE-sel kétféle kísérletet végeztünk. Először az egyes fehérjék összetételének (izoformák) és a gélen való elhelyezkedésének meghatározására mindegyik fehérjéből 1 µg-t összekeverve 3 gél futtattunk. A második kísérletben a fenti 4 oldat mindegyikét (A, B, C, D) külön-külön *E. coli* lizátumhoz (fehérjetartalom 50 µg) kevertük, feltételezve, hogy lesz az *E. coli* lizátumban olyan fehérje, ami együtt fog vándorolni az 5 közül valamelyik hozzáadott fehérjével. Minden összetételből 3 gél készült. Az 1D gélekből származó, 5 fehérjét tartalmazó sávokat kétféle módszerrel dolgoztuk fel:

GRA módszer: teljesen szokásos, redukálást és alkilezést követő tripszines proteolízis [226],

GNRNA módszer: hasonló az előzőhöz, de sem redukálást, sem alkilezést nem végeztünk.

A 2D foltok feldolgozására a GNRNA módszert alkalmaztuk, mert a fehérjék az elektroforézist megelőzően a futtatáshoz redukáltuk és alkileztük. Az A, B, C és D oldatokat 6 M guanidin oldatban DTT-vel redukáltuk és jódacetamiddal alkileztük, majd kihígítás után tripszinnel hidrolizáltuk. A gélben történt proteolíziseket mindig az azonos oldat hidrolizátumához hasonlítottuk. Az LC-MS/MS analíziseket Q-TOF Premier tömegspektrométerhez (MS^E mód) kapcsolt nanoUPLC készüléken 75 µm x 250 mm BEH130 C18 (szemcseméret 1,75 µm) oszlopon (mindegyik Waters Corp.) végeztük 0,1% hangyasav-0,1% hangyasav acetonitrilben eluensekkel (3-40% B / 20 perc, 350 nl/perc).

Ugyanabból a mintából mindig 3 párhuzamos tömegspektrometriás analízist végeztünk. Belső standardként az LC-MS/MS analízis előtt nyúl foszforiláz B hidrolizátumot adtunk a mintákhoz. Az MS/MS adatokat ProteinLynx Global Server szoftverrel (Waters Corp.), UniProtKB/Swiss-Prot fehérje adatbázis használatával végeztük.

Eredmények és megbeszélésük

A fehérjék „label free” kvantitatív vizsgálata során azt találták, hogy a MS^E üzemmódban egy fehérje 3 legintenzívebb jelű triptikus peptidjének intenzitásátlaga arányos a fehérje abszolút mennyiségével (Top3 módszer) [225, 227]. A fehérje mennyiségét mindig a mintához hozzáadott belső standardra vonatkoztatják. A módszer ma már teljesen elfogadott eszköz fehérjék oldatból történő mennyiségi meghatározására: más típusú tömegspektrométerekhez is adaptálták [228] és adatbázis-kereső szoftverekbe (MASCOT, Scaffold) is beépítették. Gélfázisú proteolíziseknél azonban a fehérjék, ill. peptidjeik más fizikai-kémiai tulajdonságai játszhatnak szerepet, mint az oldatfázisú enzimatis hasításokban, ezért a meg kellett vizsgálni, vajon Top3 módszer alkalmazható-e gélekhez is. Az oldatban és gélben történő analízis különbözőségét támasztják alá a 6. táblázat adatai, mely szerint pl. az enoláz fehérjéből, akár oldatban, akár gélben történt a tripszines hasítás, a legintenzívebb peptidek a NVNDVIAPAFVK és a VNQIGTLSESIK voltak, azonban a harmadik legintenzívebb peptidnek gélek esetén leggyakrabban a IGSEVYHNLK, míg oldatfázisú hasítás során a hidrofóbbabb IGLDCASSEFFK peptid bizonyult.

6. táblázat

Élesztő enoláz legintenzívebb triptikus peptidjeinek gyakorisága 36 analízisben

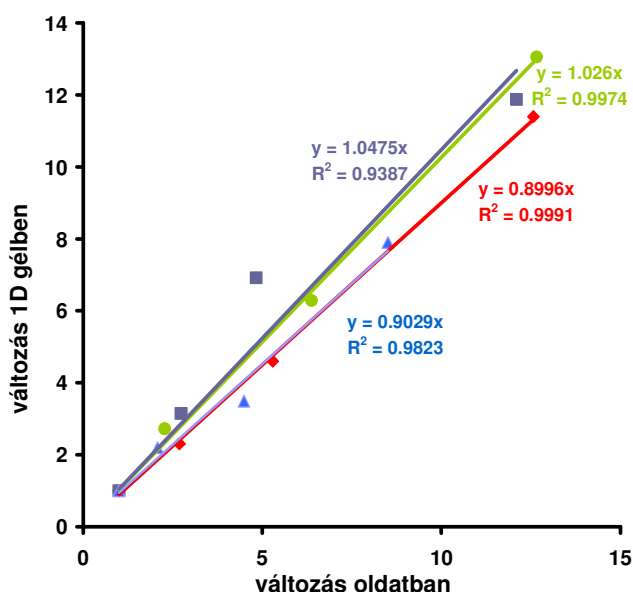
Azonosított peptidek	Peptid előfordulása a Top3-ben		
	oldat	GNRNA	GRA
NVNDVIAPAFVK	35	36	36
VNQIGTLSESIK	34	32	36
IGSEVYHNLK	1	30	23
SIVPSGASTGVHEALEMR	0	7	0
TAGIQIVADDLTVTNPKR	0	3	0
GNPTVEVELTTEK	0	0	8
AADALLK	0	0	3
TAGIQIVADDLTVTNPK	6	0	1
TFAEALR	0	0	1
IGLDCASSEFFK	29	0	0
AVDDFLISLDGTANK	3	0	0

A peptidek intenzitási sorrendjének reprodukálhatósága fehérjéről fehérjére változott, de összefoglalóan az mondható, hogy egy adott protokoll esetén az analízisek 75%-ban ugyanazt

a 3 peptidet használtuk a kvantitatív meghatározásban. A különböző protokollokat összehasonlítva általában a háromból kettő megegyezett mindegyik protokollban és az eltérés mindig az oldatfázisú proteolízis esetében volt.

A fehérjeexpresszió különböző mintákban történő összehasonlítását az 1D gélen egy sávba futtatott fehérjék tömegspektrometriás analízisével modelleztük.

Egy adott fehérje minták közötti koncentrációkülönbségeit (ami valódi minta esetén az expresszióváltozásnak felelne meg) relatív „label free” módszerrel határoztuk meg. A legkisebb mennyiségű fehérjét vettük egységnyinek és az 51. ábrán azt ábrázoltuk, hogy a különböző mintákban hányszoros mennyiségű fehérje van.



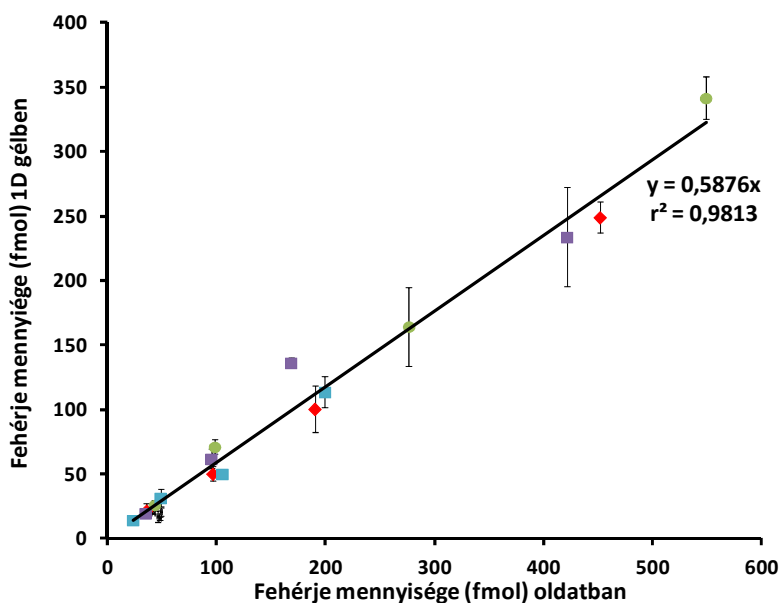
51. ábra

Egy adott fehérje (♦ alkohol-dehidrogenáz, ● szénsav-anhidráz 2, ■ enoláz 1, ▲ ovalbumin) mennyiségi arányai Top3 módszerrel különböző mintákban (oldat, 1D gél) meghatározva

A gélben kimutatott mennyiségi arányok jól követik az oldatban lévő arányokat, az egyenesek iránytangensei 1 körüliek és az egyenesek regressziós koefficiensei is közel vannak 1-hez. Különösen figyelemreméltó az eredmény, ha figyelembe vesszük a gélelektroforézis és a tripszines hasítás lépéseinek számát. Módszerünkkel megbízhatóan meg lehet határozni két gélben lévő azonos fehérjék mennyiségi arányait akkor is, ha a sávok festődési intenzitásainak összevetése nem alkalmazható a jelenlévő fehérjék nagy száma miatt. Az egy sávban lévő fehérjék abszolút mennyiségének meghatározása még nagyobb kihívást jelentett. Hasonlóképpen a fehérjék oldatban történő abszolút mennyiségének meghatározásához [225], a Top3 módszerben a gélben történő hidrolízis esetében is az egyedi fehérjék összes

kalibrációs pontja egy egyenesen helyezkedik el (52. ábra). Ez azt jelenti, hogy az egy sávban lévő különböző fehérjék mennyiségei is meghatározhatók.

A közös kalibrációs egyenes meredeksége azonban függ a választott belső standard minőségétől (nyúl foszforiláz B hidrolizátum, marha szérum albumin, enoláz 1) és alkalmazási módjától: 0,5876, 1,4348 és 0,8376. Ezért az „abszolút mennyiségi meghatározás” kifejezés itt nem helyénvaló, mert a belső standardtól függően ugyanarra a fehérjére is különböző eredményeket kapunk. A módszer viszont nagyon jól használható az egy sávban/foltban lévő fehérjék mennyiségének összevetésére: a GNRNA módszer 36 LC-MS analíziséből 36-ban helyesen lehetett megállapítani a legkisebb és legnagyobb mennyiségű fehérjét és az esetek 86 %-ban a sorrend is helyes volt. A Top3 alapján végzett mennyiségi meghatározás kovarianciája 13-15%, amely hasonló érték, mint a gélbeli festődési intenzitások alapján történő mérés.

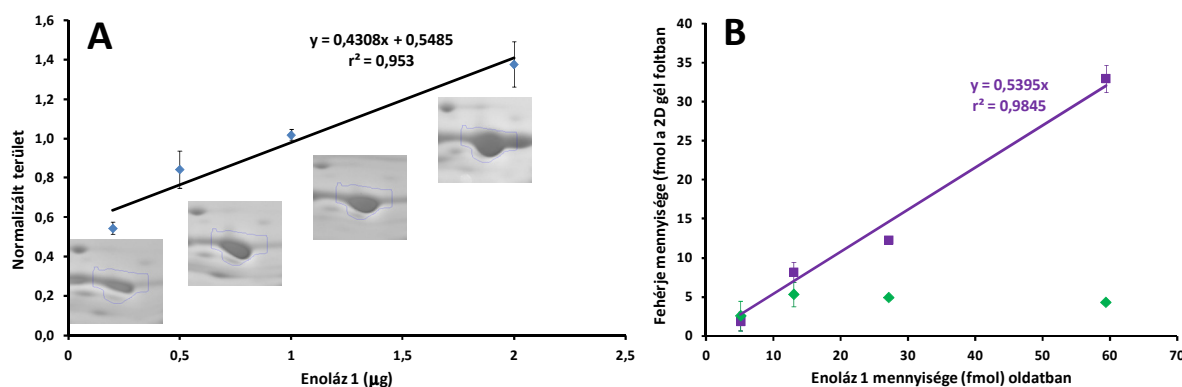


52. ábra

Különböző fehérjék egymáshoz viszonyított mennyiségei (♦ alkohol-dehidrogenáz, ● szén-sav-anhidráz 2, ■ enoláz 1, ▲ ovalbumin) (belső standard: nyúl foszforiláz B hidrolizátum)

Módszerünk igazi előnye a 2D analízis során nyilvánul meg, mert detektálni tudjuk az egy foltban lévő fehérjéket és azok mennyiségeit. Az *E. coli* lizátumhoz adott fehérjekeverékünk 2D-PAGE analízise után pl. az élesztő enoláz 1 legnagyobb foltjában kimutattunk *E. coli*-ból származó citrát szintáz enzimet (azonosító CISOY_ECOLI) is. Ha az analízis során élesztő enoláz 1-nek csak a festődés alapján meghatározott mennyiségi arányaira hagyatkozunk

(53/A. ábra) az alatta lévő másik fehérje miatt félrevezető eredményt kapunk (meredekség: 0,4308). Az MS analízissel kimutatott, minden mintában közel azonos mennyiségű *E. coli* citrát-szintáz levonása után specifikusan meg tudtuk határozni az enoláz mennyiségi változását (53/B. ábra) (meredekség: 0,5395).



53. ábra

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

A Top3 „label free” tömegspektrometriás meghatározáson alapuló általunk kidolgozott módszer kitűnően alkalmazható fehérjék 1D és 2D gélben történő relatív és „abszolút” mennyiségi meghatározására, melynek segítségével lehetőség nyílik a fehérjeexpresszió pontos meghatározására.

4.4. GABONA ALLERGÉN FEHÉRJÉINEK PROTEOMIKAI ANALÍZISE [XXXIV-XXXVI]

A gabonafélék régóta a legfontosabb táplálékaink közé tartoznak. Jellemzően magas szénhidráttartalmuk mellett más, fontos tápanyagok, így vitaminok, ásványi anyagok, élelmi rostok és fehérjeszükségletünk forrásai is. Az összetevők aránya egy-egy gabonafélén belül a fajtától, termesztési körülményektől függően jelentős eltérést mutat [229].

A gabonafélék magvaiban lévő 8-15%-nyi fehérje egyrészt tartalék- vagy raktározott fehérje (prolaminok és gluteninek), másrészt metabolikusan aktív proteinek (enzimek, albuminok, globulinok). A fehérjék összetételét és minőségét is genetikai és környezeti eredetű tényezők befolyásolják [230]. Érésdinamikai tanulmányok szerint a kémiai összetétel-változás és az emészthetőség a növekedés körülményeitől függ. Ezek a tényezők (mezőgazdasági eljárások, stresszhatások) erősebbek lehetnek a genetikai hatásnál, és a termés minőségi és mennyiségi paramétereire is hatással lehetnek [231]. Ezért nagyon fontos

mind meghatározni, mind megérteni azokat a tényezőket, amelyek hozzájárulhatnak a termés hozamának és minőségének javításához.

A növényekre ható stressz-tényezők (stresszor) közül természetes eredetűnek tekintjük a természeti környezet szélsőséges megváltozásait: a nagy fényintenzitást, hőhatást, vízhiányt, ásványi tápanyagok hiányát, alacsony hőmérsékletet, hirtelen fagyot, nagy sókoncentrációt stb., míg antropogén stresszorként tartjuk számon a herbicideket, légszennyező anyagokat, savas esőt, talajsavanyodást, toxikus nehézfémek feldúsulását, a fokozott UV-sugárzást stb.

Külső tényezők megváltozásának hatására a növények különböző védekezési mechanizmusokkal reagálnak. Az indukált védekezési mechanizmusok közt legfontosabb a hiperszenzitív reakció [232], melynek során számos fehérjét kódoló növényi gén aktiválódása figyelhető meg (stressz-fehérjék). Ezek lehetnek strukturális fehérjék, másodlagos anyagcsere enzimek vagy patogenezishez-kapcsolt („pathogenesis-related”, PR) fehérjék génjei [233]. A PR-fehérjék az alacsony pH-nak és az enzimes lebomlásnak sajátos fizikokémiai tulajdonságaik révén jól ellenállnak [234]. Elsősorban aminosavszekvencia-homológia alapján a PR-fehérjéket 14 osztályba sorolják [235]. PR-fehérje termelődése nemcsak patogén behatolókkal szemben, de különböző kémiai behatás esetén is megfigyelhető [236]. A kémiai anyagokon kívül az ozmotikus- vagy só-stressz is kiválthat PR-fehérje indukciót [237]. Ugyanannak a PR-fehérjének a termelődését különböző típusú stresszorok is kiválthatják, ami azt jelenti, hogy nagy az átfedés a különböző ingerek által aktivált gén-klaszterek között [238].

Meglepő módon a növényi eredetű élelmiszer-allergének közül soknak hasonló vagy azonos a szerkezete a PR-fehérjékével és a PR-fehérjék csoportjaiba nem sorolható allergének is gyakran valamilyen védekező funkcióval rendelkeznek [239].

Az allergiás megbetegedések száma évről évre emelkedik és az egész világon egyre növekvő problémát jelent. Az ilyen megbetegedések jelentős része élelmiszerallergia, mely túlnyomó részt a gabonákban előforduló allergén fehérjékhez kapcsolható. Az allergén fehérjék rendszerint összetett fehérjék (gliko-, lipo-, ill. nukleoproteinek) 5-70 kDa molekulatömeggel, azonban léteznek nagyobb oligomer allergének is. Általános jellemzőjük, hogy hőstabilak, ellenállnak a tápcsatorna enzimjeinek (pl. pepszines, tripszines, kimotripszines emésztés), savas izoelektromos ponttal és minimálisan két IgE-kötő hellyel rendelkeznek [240]. Az utóbbi években nagyszámú élelmiszer-allergént azonosítottak, izoláltak és jellemeztek. Csoportosításukra számos próbálkozás történt eredet, funkcióik, másodlagos-harmadlagos szerkezetük, ill. fehérje-családok szerint. Legértelmeszerűbb osztályozásuk az

aminosavszekvencia, szerkezet, valamint funkcióik alapján történő családokba, majd és szupercsaládokba sorolásuk [241].

Gabonafélék közül az egyik legértékesebb és legnagyobb területen termelt a búza. Kedvező élettani hatása mellett, mégis az egyik leggyakoribb allergénforrás a cöliakiás (lisztérzékenység) és a gabonaallergiás betegek körében egyaránt. A kétféle érzékenység hátterében alapvetően más immunológiai folyamatok húzódnak és kiváltásukban is más allergének játszanak szerepet. Eddigi ismereteink szerint a gabonaallergiát leggyakrabban kiváltó erős allergének a gliadinok (α és $\omega 5$), az α -amiláz inhibitorok (CM3, 0.53) és a nem-specifikus lipid transzfer fehérjék. A cöliákia esetében a búza gliadinok (a gluteninrel együtt adják a glutént) és a gliadinokkal azonos szerkezettel rendelkező prolaminek (rozs szekalin, árpa hordein, zab avenin) a toxikus allergén faktorok, melyek elsődlegesen a vékonybél-nyálkahártya károsodását okozzák.

A gabonák PR- és allergén fehérjéinek izolálására, azonosításához és jellemzéséhez kromatográfiás, 1D-, ill. 2D elektroforetikus, rekombináns, tömegspektrometriás és immunológiai módszereket (pl. ELISA, 1D és 2D immunblot) használnak [242, 243]. Kétdimenziós elektroforetikus szétválasztás alkalmazásával Posch és mtsai [244], valamint Weiss mtsai [245] 700 egyedi, oldható búzafehérje közül 70-80 fehérjefolt IgE-kötő aktivitását detektálták a 14–70 kDa molekulatömeg tartományban. Mamone és mtsai [246] áttekintik a legújabb proteomikai lehetőségeket gabona-allergének vizsgálatára.

Magyarország régóta és méltán híres kiváló búzájáról. A magyar búzanemesítők hírnevének a fenntartásához kívántunk hozzájárulni a tudomány legújabb módszereinek alkalmazásával. Az élelmiszerallergiás betegek számának növekedése ezért indokoltá teszi a gabonában lévő allergén fehérjék többoldalú, molekuláris alapokon történő kutatását.

4.4.1. Szárazság-stressz hatása búzafehérjék összetételére

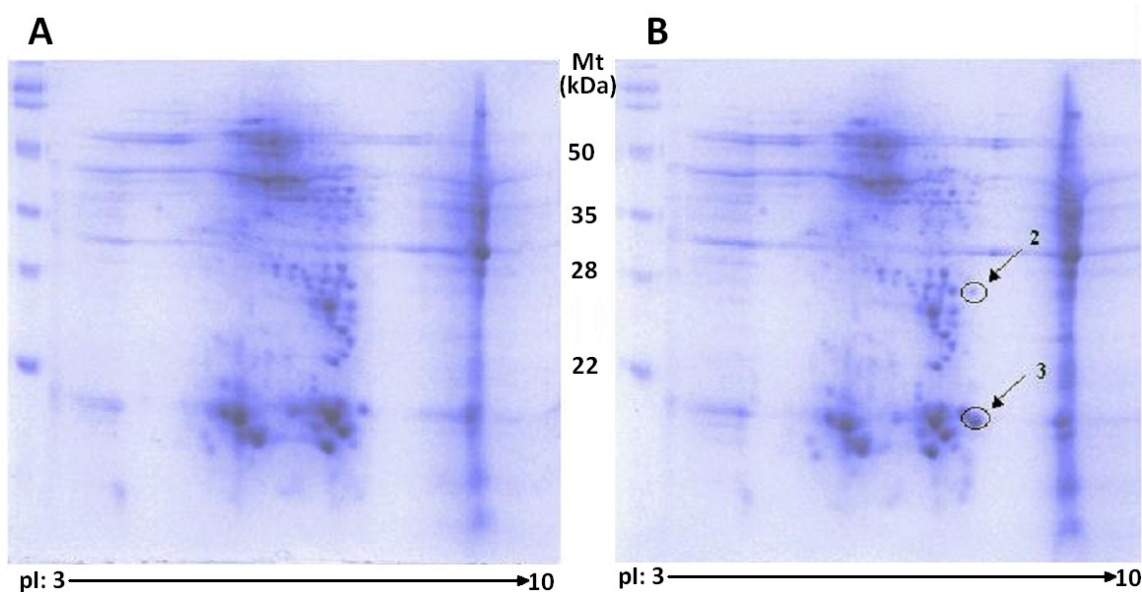
Kísérletek

A szárazság-stressz vizsgálatára a 'CY-45' tavaszi búza (szülői vonal) és a 'T-117', 'T-106-3/a', 'T-128' *bar* génre transzformált vonalait használtuk (Gabonatermesztési Kutató Kht., Szeged). A vizsgált búza vonalak kéthetes növénykéit a növény optimális fejlődéséhez elegendő vízmennyiségének egyharmadával látták el. A búzaszemek örleményének Osborne szerinti frakcionálása után a víz/só-oldható fehérjéket 2D poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét. A transzgenikus búzából származó fehérjeelektroferogram képét a kontrol szülői vonaléval és közöttük lévő eltérő foltok fehérjetartalmát tripszines hasítás után Bruker

Reflex III MALDI-TOF tömegspektrométeren (Bruker Daltonik GmbH., Németország) felvett MS és atmoszférikus MALDI ionforrással felszerelt Agilent XCT Plus ioncsapdás tömegspektrométerrel (Agilent Technologies, Németország) készített MS/MS felvételekkel azonosítottuk. Az MS/MS spektrum kiértékelése Agilent SpectrumMill segítségével, naprakész nrNCBI adatbázis alkalmazásával történt. Egy másik poliakrilamid gélből a fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk, és ezen hajtottuk végre az immunreakciót. A vizsgálatokhoz felhasznált humán szérumok klinikailag igazolt háttérű gabona-allergiás betegektől származtak.

Eredmények és megbeszélésük

A szárazság-stressz hatására a szülői és transzgenikus búza vonalakban (T-117, T-106-3/a és T-128) expresszáldó stressz-indukált fehérjéket kétdimenziós elektroforézissel történő elválasztást követően immunblot és tömegspektrometriás technikákkal vizsgáltuk. A stresszelt szülői és a transzgenikus búza vonalak fehérje-térképében a 28 kDa-nál kisebb molekulatömeg tartományban mutattunk ki eltéréseket (54. ábra).



54. ábra

A CY-45 szülői (A) és a T-117 transzgenikus búza (B) albumin-globulin frakciójának 2DE elválasztási képe
IEF: 17 cm pH 3-10 lineáris IPG csík, PAGE: 16 x 16 cm 12% poliakrilamid gél, festés CBB R-250

A transzgenikus vonalak albumin-globulin frakciójából megjelenő új fehérjefoltokat (T-128-ban 1, 4, a T-117-ben 2, 3) tripszines hidrolízis után mind „peptid tömeg térképezéssel”, mind MS/MS analízissel azonosítottuk (7. Táblázat).

7. táblázat

Transzgen bízafajtákban meghatározott, szárazság-tesztre expresszáldó fehérjék

Folt száma	Fehérje neve	Azonosító #	Szekvencia lefedettség (%)	Molekula-tömeg (Da)	pI	MS/MS alapján azonosított szekvencia
1	α -amiláz/tripszin inhibitor CM1 prekursor	S10027 P16850	57 ^a	16077	7,49	
2	27K fehérje	BAC76688	17 ^b	22773	6,06	(K)HREWESCFQK(Q), (K)VHVAIYYESLCPYSVR(F), (K)GYPLLEARCR(S)
3	α -amiláz inhibitor 0.19	AAV39515	83 ^a	13265	7,46	(K)EHGAQEGQAGTGAFPR(C), (R)DCCQQLAHISEWCR(C), (R)LPIVVDASGDGAYVCK(D)
4	Endogén α -amiláz/szubtilizin inhibitor (WASI)	P16347	16 ^b	19633	6,77	DPPPVHDTDGNELR(A), (R)HVTITGPVRDPSPGR(E)

^aszekvencia lefedettség MALDI-TOF tömegspektrométeren meghatározott „peptid tömeg térképezés” alapján^bszekvencia lefedettség AP-MALDI-ioncsapdás tömegspektrométeren meghatározott aminosavszekvencia alapján

A búza albumin-globulin frakciójában az α -amiláz/tripszin inhibitor család számos tagja megtalálható. WASI inhibitort először Petrucci és mtsai [247] mutattak ki albumin frakcióból, ami a búza amilázait nem, csak az állati vagy baktérium eredetű α -amilázt gátolta. Ez azt jelenti, hogy az inhibitor részt vesz a növény patogénekkal szembeni védekezésében. Az α -amiláz/tripszin inhibitorok nagy szerkezeti homológiát mutatnak taumatin fehérjékkel, amelyek PR-fehérjék [248]. A T-117 transzgenikus vonalban ismeretlen funkcióval rendelkező, irodalmi adatok alapján allergén tulajdonságú fehérjét, 27K proteint azonosítottunk különbségfehérjeként.

A szülői és a T-117 transzgenikus búza vonal víz/só-oldható fehérjéinek elektroferogramján gabona-allergia pozitív humán szérummal 40-45 kDa molekulatömeg tartományban mindkét bízában IgE reaktív fehérjéket detektáltunk. Szintén mindkét vizsgált mintában kimutattunk a 27 kDa molekulatömegű és pI = 7 izoelektromos pontú fehérjét. A transzgenikus búza szárazság-stressz hatására expresszált különbségfehérje 20 kDa alatti molekulatömegű 0,19 dimer α -amiláz inhibitor ugyancsak pozitív immunreakciót adott. Az α -amiláz/tripszin inhibitorok jól ismert allergének, a prolamin szupercsalád tagjai [241].

A szárazság-stressz hatására történő megjelenéséből arra következtethetünk, hogy a vizsgált transzgenikus búza vonalak (T-117, T-106-3/a és T-128a) szülői CY-45 vonalnál érzékenyebben reagálnak a vízhiányra. Az α -amiláz/tripszin inhibitorok ismert allergén fehérjék, ezért ezek a transzgenikus vonalak nem alkalmasak további termesztésre.

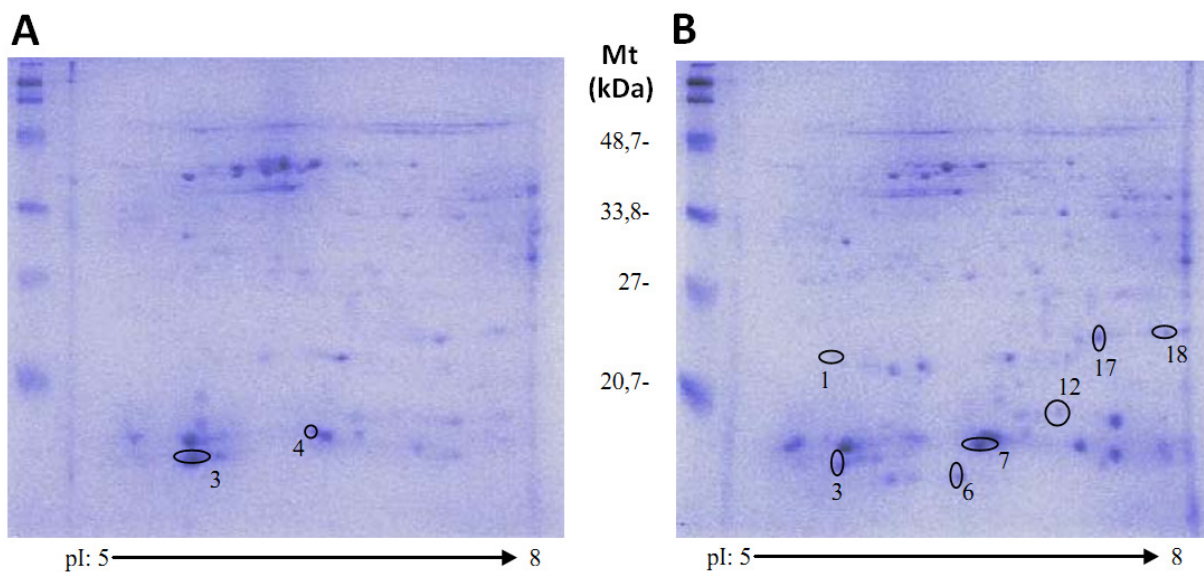
4.4.2. Emelt dózisú gombaölő szer hatása tritikále magjának fehérje-összetételére

Kísérletek

A vizsgálatokban felhasznált Bogo fantázianevű tritikále a Gabonatermesztési Kutató Kht. (Szeged) telepéről származott. A szabadtéri növényeket először az aratás előtt 51 nappal (virágzás idején) 0,6 L/ha propikonazollal, majd 43 nappal (kalászosítás idején) 1,5 L/ha emelt dózisú tebukonazollal permetezték. A tebukonazol a propikonazolhoz hasonlóan a triazolok csoportjába tartozó fungicid szer, mely a penészgombák fő sejtfal alkotó komponensének, az ergoszterolnak a bioszintézisét gátolja. A kontroll (BO) és a permetezett (BK) minták feldolgozása és analízise az előző kísérletnél leírt módszerekhez hasonlóan történt [249].

Eredmények és megbeszélésük

A tritikále minták albumin-globulin frakcióját 2D-PAGE-val (pI 5,0-8,0 és 5-120 kDa) választottuk el (55. ábra), mert előkísérletekben ebben az izoelektromos pont-tartományban detektáltuk a legtöbb változást.



55. ábra

Kezeletlen (A) és emelt dózisú fungicidekkel kezelt (B) Bogo tritikále albumin-globulin frakcióinak 2 DE képe (a számozott foltok az azonosításra kivett fehérjéket jelölik)
IEF: 17 cm pH 5-8 lineáris IPG csík, PAGE: 16 x 16 cm 12% poliakrilamid gél, festés CBB R-250

A kontrol és emelt dózisú fungiciddal kezelt minták között jelentős fehérjeexpresszió-különbséget találtunk. A legnagyobb eltéréseket mutató foltokból tripszines hidrolízis után MALDI-TOF tömegspektrométeren „peptid tömeg térképezés”-sel azonosítottuk a fehérjéket

(8. táblázat). Az emelt dózisú fungiciddal történt kezelés hatására beindult védekezési mechanizmus hatására az előző fejezetben megismert kiterjedt α -amiláz inhibitor-család néhány tagjának megváltozott expresszióját itt is kimutattuk. Ezen fehérjék patogének elleni védelmi funkciójáról és allergén jellegéről többen is beszámoltak [250, 251]. A fungicid elleni védekezésben megjelent két endogén α -amiláz/szubtilizin inhibitor is, melyek eredetileg a mikrobiális eredetű proteázokat gátolják. Sikerült kimutatnunk egy penész rezisztencia fehérjét is (AAT39944). Két foltban is növekedett az expressziója ugyanannak a proteinázgátló fehérjének (20798981). Az eredményekből látszik, hogy a különböző stresszorok (szárazság, herbicid) részben hasonló válaszokat váltottak ki, ami azt jelenti, hogy ezek a fehérjék a növények általános védelmi rendszerének tagjai.

8. táblázat

Bogo tritikáléban emelt dózisú fungicidekkel történő kezelés hatására megváltozott expressziójú fehérjék adatai

Minta	Azonosító	Fehérje	Faj	Molekula-tömeg (Da)	pI	Szekvencia-lefedettség
BO/3	100769	alfa-amiláz inhibitor	Triticum aestivum	13056,2	5.38	42%
BO/4	56480630	0,19 dimer alfa-amiláz inhibitor	Triticum aestivum	13191,3	5.23	24%
BK/1	65993781	dimer alfa-amiláz inhibitor	Triticum aestivum	15046,4	5.59	31%
BK/3	54778503	0,19 dimer alfa-amiláz inhibitor	Triticum aestivum	13256,4	5.73	24%
BK/6	123975	Endogén α -amiláz/szubtilizin inhibitor (WASI)	Triticum aestivum	19633,1	6.77	17%
BK/7	123975	Endogén α -amiláz/szubtilizin inhibitor (WASI)	Triticum aestivum	19633,1	6.77	41%
BK/12	AAT39944	Feltételezett fitoftóra-rezisztencia fehérje	Solanum demissum	14652,4	5,7	6,3%
BK/17	P16347	Endogén α -amiláz/szubtilizin inhibitor (WASI)	Triticum aestivum	19848,9	6,9	38%
BK/18	P16347	Endogén α -amiláz/szubtilizin inhibitor (WASI)	Triticum aestivum	19848,9	6,9	68%
BK/4	20798981	WCI proteináz inhibitor	Triticum aestivum	12944,1	7,42	16%
BK/5	20798981	WCI proteináz inhibitor	Triticum aestivum	12944,1	7,42	16%

Gabonaallergiás szérummal végzett immunblot-tal az azonosított fehérjék közül a BO/4 jelű dimer α -amiláz inhibitor, a BK/1 jelű dimer α -amiláz inhibitor és a BK/17 jelű endogén α -amiláz/szubtilizin inhibitor adott pozitív reakciót, ami megerősíti azokat az irodalmi adatokat, melyek szerint a növényi védekező rendszer fehérjeinek nagy többsége ismert allergén fehérje.

4.4.3. Magyarországi gabonafajták és pszeudocereáliák allergén fehérjéinek vizsgálata

Az élelmiszer-biztonsággal kapcsolatos módszertani fejlesztések között kiemelt szerepet kapott a táplálék allergének kimutatása és mennyiségi meghatározása. A rutin diagnosztikában az allergének élelmiszerekből történő kimutatása leggyakrabban immunológiai módszereket alkalmaznak [240, 252], de az új proteomikai technikák is egyre inkább terjednek [253].

Kísérletek

A vizsgálatban felhasznált gabona minták (búza (*Triticum aestivum*), GK Tisza, 2004, *Triticum. spelta*, ÖKO-10, 2004, *Triticum durum*, D-78, 2004, (*Triticum aestivum*), GK Cipó, 2004, (*Triticum aestivum*), CY-45 Grandstar, 2001, rozs (*Secale cereale*), Amilo, 2004, Tritikálé (*Triticosecale sp.*), tavaszi, EMBR 18, 2004, árpa (*Hordeum vulgare*), tavaszi, STC I. 22-03, 2004 és csupasz zab (*Avena nuda*), tavaszi, GK Zalán, 2004) és pszeudocereália minták (amaránt (*Amaranthus cruentus*), GK Maros, 2005, hajdina (*Fagopyrum esculentum*), 430 törzs, 2003, kukorica (*Zea mays*), Ella SC, 2004 és rizs (*Oryza sativa*), Bioryza, 2003) a Gabonatermesztési Kutató Kht.-tól (Szeged) származnak.

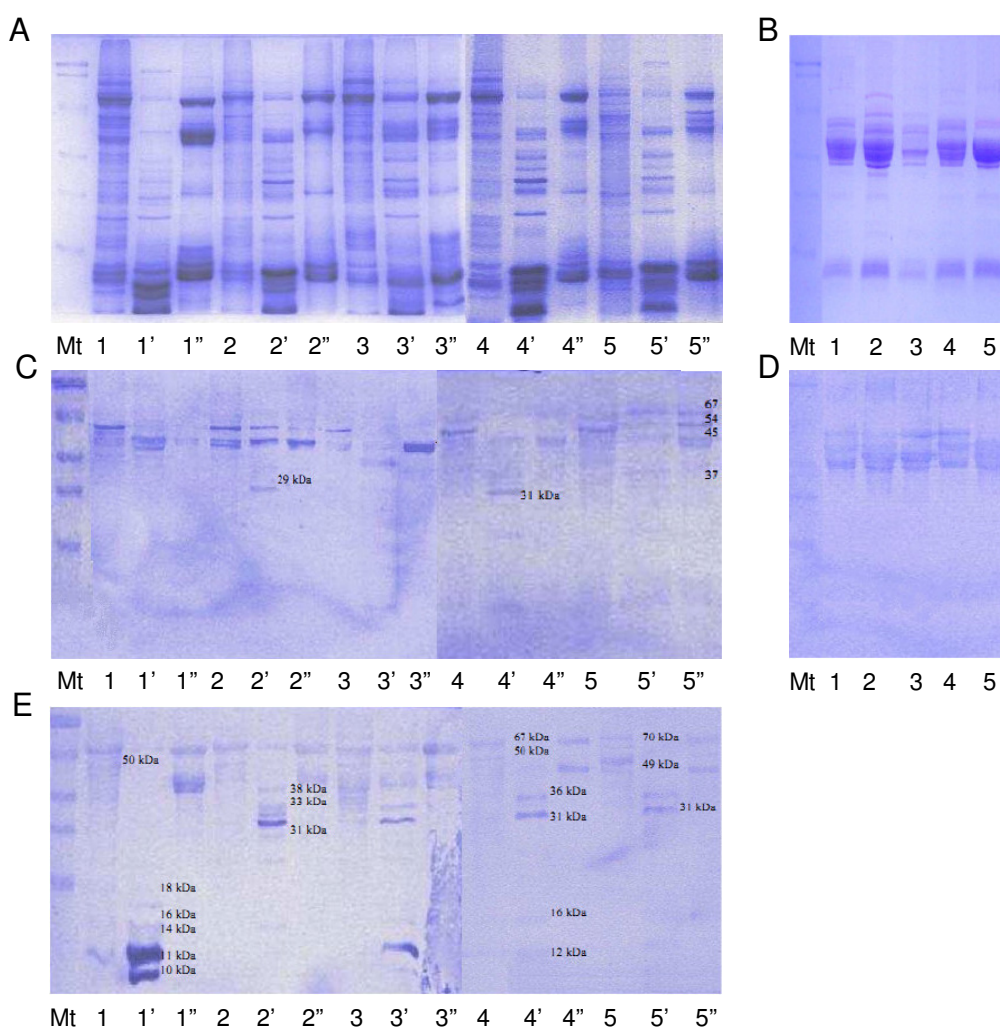
A magvak albumin/globulin frakcióját 50 mM Trisz-HCl pufferrel (pH 8,5) extraháltuk, az alkohol oldható frakciót 70% etanollal nyertük. Fehérjék elválasztása SDS-PAGE-val 15%-os poliakrilamid gélen történt. Immunblottolás után az allergén fehérjék kimutatása klinikailag igazolt gabona-allergiás (IgE mediált) és cöliákiás (IgA mediált) betegek szérumával történt. Fehérjeazonosítás a gélcsíkok kivágása, redukálása, alkilezése és tripszines hidrolízise után LC-MS/MS módszerrel történt. Az elválasztást 0,075 x 150 mm-es Zorbax 300SB-C18, 3,5 µm oszlopon, az analízis pedig Agilent XCT ioncsapdás tömegspektrométerrel végeztük. Az MS/MS adatok kiértékelésére SpectrumMill szoftvert és az aktuális Uniprot-trEMBL adatbázist használtuk.

Eredmények és megbeszélésük

Vizsgálatainkat hazai búza allergének és a velük keresztreagáló gabonafehérjék vizsgálatára fókuszáltuk. A búzán kívül olyan gabonákat, illetve pszeudocereáliákat is vizsgáltunk, amelyek a búzával együtt szintén a cöliákia kiváltói (búzával keresztreagálók: tritikálé, rozs, árpa, zab) lehetnek, illetve amelyek nem okoznak klinikai tüneteket a cöliákiás betegekben (búzával nem-keresztreagálók: amaránt, hajdina, kukorica, rizs). Minden vizsgálatba vont hazai gabonában, illetve pszeudocereáliában nemcsak a cöliákiás, hanem a

gabonaallergiás betegekben potenciálisan klinikai tüneteket kiváltó fehérjéket is monitoroztuk.

A vizsgált öt búzafajta víz/só-oldható frakciójának (1, 2, 3, 4, 5), ill. ioncserés kromatográfiával dúsított két frakciójának (1', 1'', 2', 2'', 3', 3'', 4', 4'', 5', 5'') (58. ábra A), ill. alkohololdható glutén frakciójának SDS-PAGE képét mutatja be 56. ábra (B). Ugyanezen az ábrán látható a víz/só-oldható és alkohol-oldható frakcióinak immunblotja cöliákiás, ill. alkohololdható frakciójának immunblotja gabonaallergiás betegek szérumával reagáltatva. Ioncserés dúsítás hatására láthatóvá váltak (eltérő mértékben) a víz/só-oldható frakciók IgE antitestekkel (gabona-allergiás beteg széruma) reagáló allergén fehérjei, melyek minden minta esetében a 10-16 kDa, 31- 37, 45-70 kDa molekulatömeg-tartományba helyezkedtek el.



56. ábra

Magyar búzafajták víz/só (A), ill. alkohol-oldható (B) frakcióinak SDS-PAGE képe, valamint cöliákiás (C, D), ill. gabona-allergiás betegek szérumával (E) készült immunoblotjai

Mt, 1: *T. aestivum*, GK Tisza, 2004, 2: *T. spelta*, ÖKO-10, 2004, 3: *T. durum*, D-78, 2004, 4: *T. aestivum*, GK Cipó, 2004, 5: *T. aestivum*, CY-45 Grandstar

A különböző búzafajták alkohololdható fehérjefrakcióinak cöliákiás humán szérummal szemben IgA-reaktívnak bizonyuló fehérjéi majdnem mindegyik fajtában egyformán 37-54 kDa sávban helyezkedtek el. A többi gabona és pszeudoceriália víz/só- és alkohololdható frakcióinak vizsgálatakor az albumin/globulin frakcióban erősebb IgE pozitivitást találtunk a gabonáknál, míg jóval kisebbet a pszeudocereáliák esetén. A zab és a kukorica alkoholos extraktuma is mutatott IgE-reakciót. A rizs víz/só-oldható frakciója tartalmazott a legkevesebb IgA-pozitív allergént, de meglepő, hogy a cöliákiás diétából nem kizárt amaránt és hajdina fehérjék IgA-reaktivitást mutattak. Az alkohololdható frakciók közül az amarant, hajdina és a rizs volt mentes cöliákiás tüneteket okozó allergénektől.

Proteomikai fehérjeazonosításra a búzák közül a *T. aestivum*, GK Cipó, 2004 mintát választottuk, mert ez minden olyan molekulatömeg-tartományban tartalmazott gabonaallergiás humán szérumokkal szemben IgE-reaktív fehérje csoportokat, melyek más búzafajtáknál is felismerésre kerültek. A búzával keresztreagáló és nem-keresztreagáló gabonák/pszeudocereáliák extraktumaiból 1-1 nagyon gyakori és intenzív sáv került azonosításra. A fehérjéket szigorú kritériumok alapján, az LC-MS/MS mérések eredményeinek nrNCBI Plant adatbázisban végrehajtott keresése alapján azonosítottuk (Függelék, 6. táblázat). Búzában a már korábban is megtalált α -amiláz inhibitor családon túl (monomer, dimer, CM2, CM3, CM16, CM17 fehérje prekursor) ismert allergén fehérjéket [241], mint xilanáz inhibitorokat, szerpineket (Z1A, Z1C, Z2A, Z2B), ns-LTP prekurzort, HMW glutenint és avenint találtunk. A pszeudocereáliák közül az amarantban agglutinin, hajdinában 13S globulint (magi tároló protein 2, 3), kukoricában leginkább enzimeket (endokitináz A, B) azonosítottunk, melyek nem voltak ismert allergének, míg a rizsben az allergén cupin szupercsalád tagját azonosítottuk. A búzával rokon rozsban az ismert allergén szerpinen kívül béta-amilázt, az árpában Hsp70-t, a zabban különféle enzimeket (alfa-1,4-glükán-protein szintáz, aszpartát aminotranszferáz, fruktóz-biszfoszfát aldoláz, GAPDH) azonosítottunk.

Az eredmények azt mutatják, hogy az idők folyamán a búza sok fehérjéje vált allergénné, alakult ki ellene IgE, ill. IgA antitest, melyek atópiás személyekben allergiás reakciókat válthatnak ki. Az emberi táplálkozásban sokkal kisebb szerepet játszó egyéb gabonafélék is tartalmaznak a búzáéhoz hasonló ismert allergéneket (pl. szérpin), azonban jóval kisebb mennyiségben. Eddig nem volt ismert, hogy a pszeudocereáliák víz/só frakciója is tartalmaz IgA-aktív fehérjéket, azonban ezek nem glutén (gliadin + glutenin) eredetűek.

4.5. BIOKÉMIAI KUTATÁSI PROBLÉMÁK MEGOLDÁSÁNAK ELŐSEGÍTÉSE PROTEOMIKAI FEHÉRJEAZONOSÍTÁSSAL

A fehérjék kulcsszerepet játszanak minden biológiai folyamatban. Funkcióik megismerésére és magyarázatára első lépés aminosavszekvenciájuk, szerkezetük, poszttranszlációs módosításaik, expressziójuk felderítése és kölcsönható partnereik feltérképezése. A proteomikai vizsgálatok eredményei rendszerint újabb problémákat vetnek fel, teóriákat generálnak, amelyeket további kísérletekkel kell magyarázni, igazolni. A továbbiakban erre mutatok be példákat a közreműködő partnereimmel végzett munkákból.

4.5.1. Méhlepény-fehérjék (Placental Proteins, PP) proteomikai vizsgálata [XXXVII-XLII]

Terhesség alatt a szérumban új fehérjék jelennek meg, melyek a méhlepényben termelődnek, és fontos szerepet játszanak a magzat és a méhlepény kialakulásában, fejlődésében, valamint a terhesség fenntartásában. Szülés után génjeik represszálódnak, de különböző kóros állapotokban újból kifejeződhetnek [254]. Olyan placenta fehérjék, mint a humán koriogonadotróp hormon (hCG), a humán placentáris laktogén (hPL) vagy enzimek, mint a hőstabil alkalikus foszfatáz régóta ismertek. Az elválasztástechnikai módszerek fejlődésével a megismert méhlepény-fehérjék száma fokozatosan növekedett. Az 1980-as években Hans Bohn 20 membrán-asszociált és 26 oldható szöveti fehérjét izolált placentából, az akkori szinten jellemezte azokat és antiszérumokat is termelt ellenük [255, 256]. Néhányuknak felismerték biológiai funkcióját, de legtöbbjüké ismeretlen volt.

Az elmúlt évek során pécsi kollégák számos méhlepény-fehérjét izoláltak (pl. a PP13, PP17a, PP17b, PP18a, PP18b, PP20, PP23 és P25) és próbálták funkcióikat megtalálni [257-259]. Közös munkánk akkor kezdődött, amikor megkértek, hogy az izolált vagy rekombináns módszerekkel előállított fehérjéket azonosítsam, hogy utána funkcióikat igazolhassák. Néhány fehérjének meg akartuk határozni kölcsönható partnereit is, hogy megismerjük azokat a folyamatokat, amelyeken keresztül hatásukat kifejtik.

Kísérletek

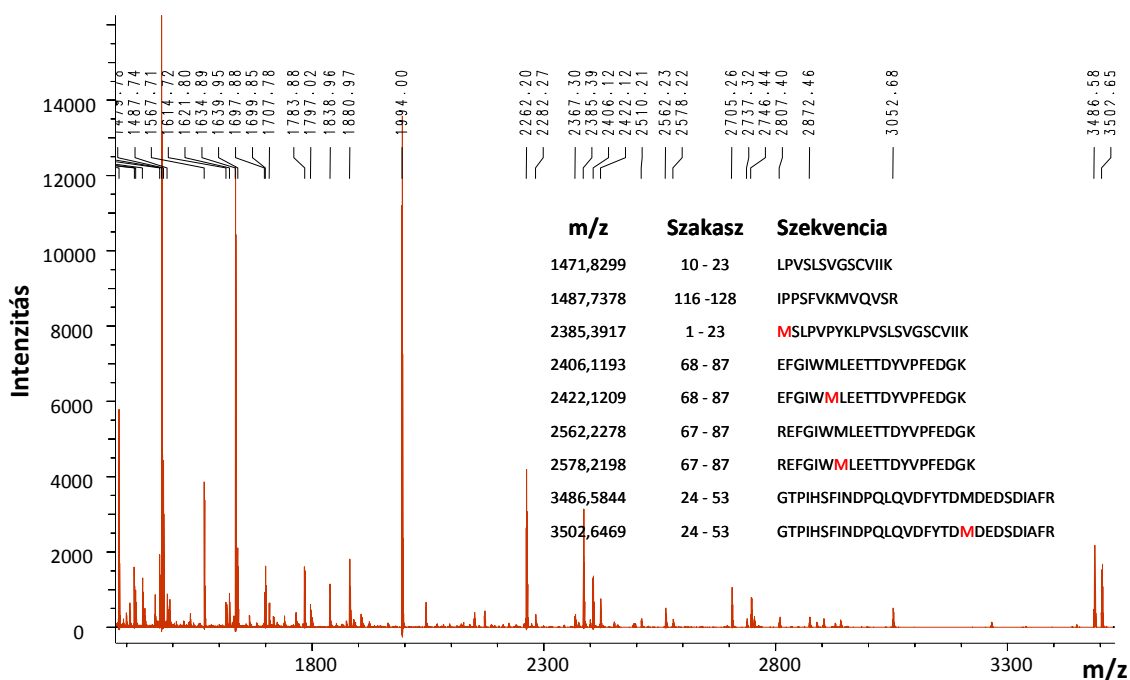
Az egyes PP-fehérjéket terminális humán placentából, ill. humán sejt kultúrákból izolálták [257-259]. Génjeik azonosításához a placenta cDNS könyvtárát fág-display technikával, a PP-fehérjékre specifikus antiszérumokkal szűrték, majd az izolált klónokat automata Genetic Analyzer-rel szekvenálták. Gén-adatbázisokban történt keresés után a

feltételezett fehérjét az izolált és/vagy rekombináns fehérjék proteomikai módszerekkel történő azonosításával igazoltuk.

A PP-fehérjék körültekintő és alapos tisztítása után a fehérjék tisztaságát poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük, majd a gél tiszta sávjait kivágva DTT-vel redukáltuk, jódcetamiddal alkileztük, majd tripszinnel hasítottuk. A hidrolízissel kapott peptideket kioldottuk a gélből, majd ZipTip C18 mikropipetta-hegybe integrált mikrooszlopon megtisztítottuk. A mintákat 2,5-dihidroxi-benzoessavval történt összekeverés után Bruker Reflex III MALDI-TOF tömegspektrométeren „peptid tömeg térképezés”-t végeztünk és a legintenzívebb peptidnek PSD MS/MS módszerrel meghatároztuk a szekvenciáját.

Eredmények és megbeszélésük

A **PP13** legnagyobb mértékben a placentában termelődik, de bizonyos anyai és magzati szövetben is kimutatható terhesség alatt [256]. Két azonos, 16 kDa molekulatömegű láncát diszulfidhíd köti össze. Glikoprotein, de szénhidráttartalma csak 0,6%. Klónozássa, szekvenciaanalízise és számítógépes modellezése nagy konzervált szerkezeti és funkcionális homológiát mutatott a galektin családdal. Szerkezetének 3D-modellezéséből egy konzervált szénhidrátkötő hely léteire következtettek, ezért galektin-13-nak nevezték el [260]. A PP13 hidrolizátumának MALDI-TOF analízise igazolta (57. ábra), hogy a PP13 azonos a galektin-13-mal (azonosítási #: NM_013268, Mt: 16336, pI: 5,4, lefedettség 56%).



57. ábra

A PP13 hidrolizátumának MALDI-TOF MS spektruma, ill. a csúcsokhoz tartozó fragmensek, mátrix: DHB

Kimutattuk, hogy hasonlóan a „Charcot-Leyden crystal” protein/galektin-10-hez, mind az izolált, mind a rekombináns PP-13 is rendelkezik gyenge lizofoszfolipáz aktivitással, valamint jól kötik az N-acetil-laktóزامint, mannózt és N-acetil-glükóزامint, valamint hatékonyan agglutinálja az eritrocitákat. A homodimer PP13 redukciójával cukorkötése csökken, míg agglutináló képessége megszűnik, nem úgy, mint más galektineké [261]. Kimutattuk, hogy a rekombináns PP13 nem, de a placentából izolált fehérje foszforilált, de a foszforiláltsági állapota nem befolyásolta cukorkötő képességét. A galektin-3 foszforilálása ki/be kapcsolja annak monoszacharidkötő képességét [262].

A PP13 kölcsönható partnereinek felderítéséhez mind az izolált, mind a rekombináns fehérjéből immunaffinitás oszlopot készítettünk és placenta, ill. főtális májsejt-tenyészet homogenizátumaiból „kihalásztuk” a PP13-hoz specifikusan kötődő fehérjéket. Az affinitásoszlopról leoldott specifikusan kötött fehérjék SDS-PA-gélen végzett analízise két intenzív sávot mutatott (38 és 41 kDa), melyeket redukció, alkilezés és a tripszines hidrolízis után MALDI-TOF tömegspektrométerrel azonosítottunk (9. Táblázat).

9. táblázat

PP13 fehérjéhez specifikusan kötődő fehérjék MALDI-TOF MS „peptid térképezése”

Mért tömeg [M+H] ⁺	Számított tömeg [M+H] ⁺	Pozíció	Szekvencia	Módosítás
38 kD sáv: annexin II				
1035,6177	1035,5297	213–220	(K) WISIMTER (S)	–
1086,5769	1086,4856	29–37	(K) AYT NFDAER (D)	–
1086,5769	1086,6821	287–295	(K) VLIRIMVSR (S)	–
1094,5963	1094,5271	69–77	(R) QDIAFAYQR (R)	Glp
1111,6201	1111,5536	69–77	(R) QDIAFAYQR (R)	–
1244,6868	1244,6235	136–145	(R) TNQELQEINR (V)	–
1439,8798	1439,7238	291–302	(R) IMVSRSEVDMLK (I)	2 Met-O
1460,7615	1460,6732	234–245	(K) SYSPYDMLIESIR (K)	–
1542,9514	1542,8491	50–63	(K) GVDEVTIVNILTNR (S)	–
1588,8890	1588,7681	234–246	(K) SYSPYDMLIESIRK (E)	–
1778,0156	1777,8642	120–135	(K) GLGTDEDSLIEIICSR (T)	–
1909,0682	1908,8827	180–196	(R) AEDGSVIDYELIDQDAR (D)	–
2065,2063	2064,9838	179–196	(R) RAEDGSVIDYELIDQDAR (D)	–
41 kDa sáv: beta/gamma aktin				
1198,7517	1198,5228	44–54	(K) DSYVGDEAQS (R)	–
1198,7517	1198,7061	22–32	(R) AVFPSIVGRPR (H)	–
1203,6632	1203,5614	33–43	(R) HQGVMVGMGQK (D)	2 Met-O
1499,7963	1499,6767	353–365	(K) QEYDESGPSIVHR (K)	Glp
1515,8512	1515,7497	78–88	(K) IWHHTFYNELR (V)	–
1628,0516	1627,7716	353–366	(K) QEYDESGPSIVHRK (C)	Glp
1791,0558	1790,8925	232–247	(K) SYELPDGQVITIGNER (F)	–
1954,2281	1954,0650	89–106	(R) VAPEEHPVLLTEAPLNPK (A)	–
2215,3066	2215,0705	285–305	(K) DLYANTVLSGGTTMYPGIADR (M)	–
2807,5914	2807,3119	207–231	(K) EKLCYVALDFEQEMATAASSSSLEK (S)	–

Mind a placentából, mind a WRL-68 sejtenyészetből izolált 38 kDa tömegű fehérje annexin II-nek (azonosítási #: NM_004039), míg a 41 kDa molekulatömegű béta/gamma aktinnak (azonosítási #: NM_001101) bizonyult. A placenta és főtális májsejtek szinciciotrofoblasztjainak perinukleáris festése kimutatta galektin-13 expresszióját és a brush border membránjának erős festődése megerősítette a galektin-13 sejtfelületre történő externalizációját. Kimutattuk az annexin II és PP13 együttes előfordulását, ami arra utal, hogy a PP13, hasonlóan más galektinekhez [263], a PP13 is mikrovezikulumokban, aktinnal és annexin II-vel együtt, ektocitózissal kerül a sejt felszínére [264].

Eredményeink alapján a PP13/galektin-13 speciális hemosztatikus és/vagy immunbiológiai szerepet játszik az anyai-magzati vérkeringés csatlakozásában, de felvetődik szerepe a placenta kifejlődésében is.

A **PP17**-t először méhlepényből izolálták [265], de később más periférális szövetben is kimutatták. Terhesség alatt magasabb szérumszintet mértek, illetve emelkedett koncentrációt mutatott különféle tumoros (pl. méhnyakrák) betegeknél is [266]. A PP17-nek négy variánsát, egy 30 kDa (PP17a), egy 48 kDa (PP17b), egy 60 kDa (PP17c) és egy 74 kDa (PP17d) mutatták ki [266], és szekvenálták a PP17-t kódoló placenta cDNS-t is [267]. Legközelebbi homológjai a humán adipofilin és az egér „adipóz differenciálódással kapcsolatos fehérje”, valamint a humán és patkány perilipin, a fő hormonregulálta zsírsajt-specifikus foszfoprotein. A PP17b intracelluláris szerepéről másfél évtizede folyik a vita, mert vannak, akik a TIP47 név alatt megismert, a mannóz-6-foszfát-receptor transzportjáért felelős fehérjével azonosítják [268], míg mások az intracelluláris lipidmetabolizmussal hozzák kapcsolatba [269].

A PP17-nek az adipofilinhez és prelipinhez való hasonlósága és saját eredményeink is inkább az utóbbi vélekedést támasztják alá, miszerint a PP17 „lipid storage droplet protein”-ek családjába tartozik. Kollégáim specifikus antiszérumot használva PP17-t mutattak ki HeLa sejtek lipid frakciójában, ill. humán tej „lipid csepp membrán”-frakciójában (MLGM), valamint konfokális mikroszkóppal neutrális zsírcseppekkel való kolokalizációját találták tumoros szövetben és HeLa sejtekben. A specifikus anti-PP17 szérum immunglobulinjait Sepharose 4B-hez kötve immunaффinitási oszlopot készítettünk, aminek segítségével HeLa-sejt, ill. humán tej MLGM extraktumából izoláltuk az antitesthez kötődő fehérjét. SDS-PAGE gélen történt elválasztás után a 30 kDa, 48 kDa és 60 kDa sávokat redukció, alkilezés és a tripszines hidrolízis után MALDI-TOF tömegspektrométerrel („peptid tömeg térképezés”) és két legintenzívebb csúcs PSD MS/MS vizsgálatával azonosítottuk. A 48 kDa molekulatömegű fehérje a 434 aminosavas PP17b-nek (azonosító #: AAD11622) (10.

Táblázat), a 30 kDa-os 46% szekvenciafedettséggel PP17a-nak (azonosító #: AF051314), a 60 kDa molekulatömegű pedig a 30 kDa PP17a dimerjének bizonyult.

10. Táblázat

Anti-PP17 szérummal izolált 48 kDa fehérje tripszines hidrolizátumának MALD-TOF MS analízise.

Azonosított fehérje: PP17b (AAD11622)

Mért tömeg [M+H] ⁺	Számított tömeg [M+H] ⁺	Pozíció	Szekvencia	Módosítás
1039,6150	1039,4849	48–55	(R) QE QSYFVR (L)	Glp
1056,6356	1056,5114	48–55	(R) QE QSYFVR (L)	–
1169,6793	1169,5703	65–74	(R) QHAYEHS LGK (L)	–
1234,7593	1234,6717	1–12	(–) MVL SGVDTV LGK (S)	1Met-O
1295,7397	1295,6596	132–142	(K) EPPKPEQVESR (A)	–
1438,8454	1438,7555	63–74	(R) LRQHAYEHS LGK (L)	–
1438,8454	1438,7555	65–76	(R) QHAYEHS LGKLR (A)	–
1470,7957	1470,7316	114–124	(K) LHQM WLSWNQK (Q)	–
1486,7971	1486,7265	114–124	(K) LHQM WLSWNQK (Q)	1Met-O
1707,8661	1707,9407	63–76	(R) LRQHAYEHS LGKLR (A)	–
1835,0596	1834,9299	31–47	(R) IATSLDGF DVASVQQQR (Q)	–
2059,1532	2059,0460	125–142	(K) QLQGPEKEPPKPEQVESR (A)	Glp
2067,0806	2066,9783	13–30	(K) SEEWADNHLPLTDAELAR (I)	–
2073,2239	2073,1266	82–100	(R) AQEALLQLSQALSLMETVK (Q)	–
2076,2001	2076,0726	125–142	(K) QLQGPEKEPPKPEQVESR (A)	–
2089,2453	2089,1215	82–100	(R) AQEALLQLSQALSLMETVK (Q)	1Met-O

Citosztatikus szerek (carboplatin, paclitaxel) HeLa sejteken apoptózist és PP17b-termelést indukál, mely proteinkináz C inhibitorral csökkenthető volt. Ez azt jelzi, hogy a NF-κB és az AP-1 transzkripció faktorok a folyamatban érintve vannak [270]. A megnövekedett A dibutiril cAMP, phorbol mirisztát-acetát hatására bekövetkező PP17b-termelés arra utal, hogy lényeges szerepe van a sejt differenciálódásban [271].

Eredményeink arra utalnak, hogy a PP17b egy neutrális zsírcsepp-asszociált fehérje és expresszióját proteinkináz C-függő folyamatok vezérlik.

A **humán placenta protein 20-t** (PP20) 1985-ben méhlepényből izolálták és meghatározták alapvető fizikai-kémiai tulajdonságait. A pp20 két azonos alegységből álló homodimer glikoprotein, melyben a láncokat nem-kovalens erők tartják össze. Kódoló gén-szekvenciájának azonosítása után a pécsi laboratóriumban rekombináns technikával előállították a 243 aminosavból álló 27 kDa molekulatömegű monomer fehérjét. Szekvenciája azonos a humán tiamin-pirofoszfokináz (hTPK) alegységével és legközelebbi homológja az

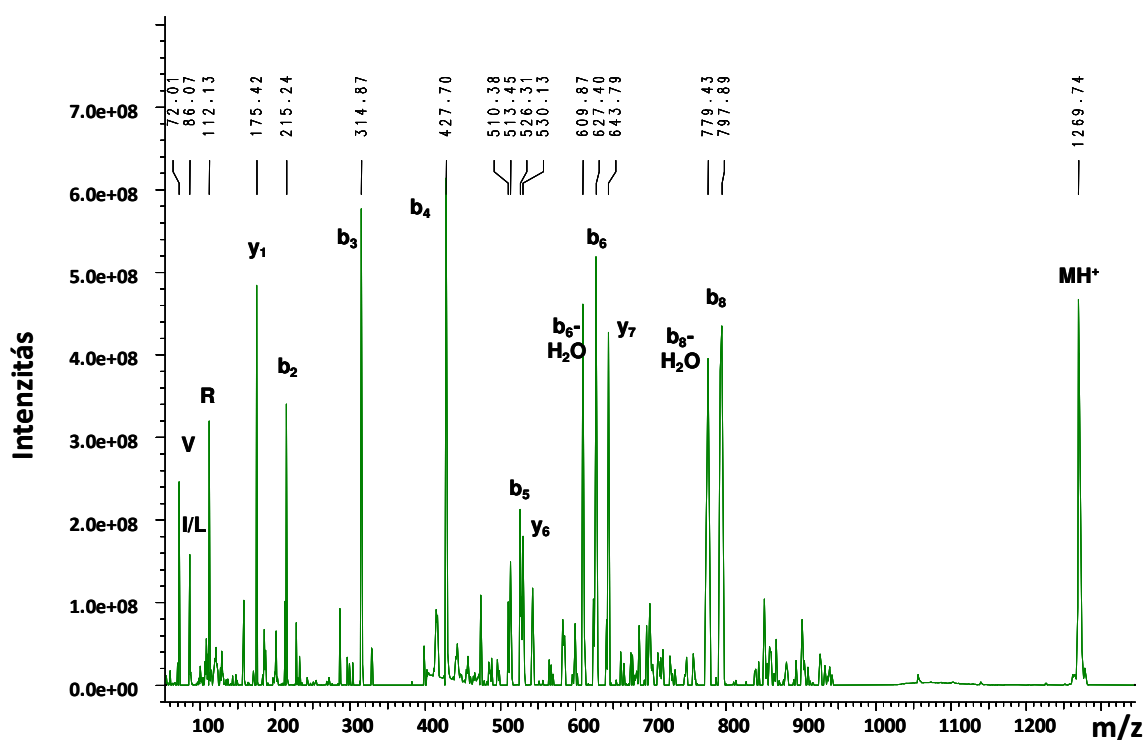
egér TPK. Western-blot módszerrel humán magzati és felnőtt-szövetekben is detektáltuk a hTPK enzimet, amely kimutatható volt tumorsejtekben és szövetekben egyaránt.

A placentából izolált PP20 SDS-PA-géljén két csík volt látható, egyik 27 kDa, másik 54 kDa környékén. A gélből kivágott fehérjét redukció, alkilezés és a tripszines hidrolízis után MALDI-TOF tömegspektrométerrel („peptid tömeg térképezés”) (11. táblázat) és egyik ionjának PSD MS/MS vizsgálatával azonosítottuk (58. ábra).

11. táblázat

PP20 tripszines hasításának termékei MALDI-TOF tömegspektrométerrel meghatározva

Mért tömeg [M+H] ⁺	Számított tömeg [M+H] ⁺	Pozíció	Szekvencia	Módosítás
1095,6713	1095,5322	52–60	(R) LYDITEGER (E)	–
1269,8753	1269,7531	119–131	(K) VDVIVTLGGLAGR (F)	–
1626,1082	1625,9590	116–131	(K) DLKVDVIVTLGGLAGR (F)	–
1928,1423	1927,9740	19–33	(K) YCLVILNQPLDNYFR (H)	–
1964,0617	1963,8707	87–103	(K) GCELISTPDQDHTDFTK (C)	–
2367,3637	2367,1621	61–80	(R) ESFLPEFINGDFDSIRPEVR (E)	–



58. ábra

A PP20 1269,9 (*m/z*) peptidjének MALDI-PSD MS/MS spektruma (b- és y-ionok).

Szekvencia: VDVIVTLGGLAGR

mátrix: DHB

Az nrNCBI adatbázisban történt keresés után mindkét sávból a tiamin-pirofoszfokináz enzimet (azonosító # AAK01351) azonosítottunk, ami bizonyítja az 54 kDa sávban lévő fehérje dimer jellegét. LC-MS módszerrel kivitelezett tiamin-pirofoszfokináz enzimaktivitás tesztben mind az izolált, mind a rekombináns PP20 fehérjék aktívnak bizonyultak. Western blot módszerrel PP20/hTPK jelenlétét mutattuk ki minden normál és tumoros felnőtt és magzati szövetben (közel egyforma mennyiségben), de egészségesek vérében nem. Ez igazolta Nosaka és mtsai [272] eredményeit, de bizonyos szempontból ellentétben van azzal az állítással, mely szerint egérben a TPK mRNS szövetspecifikusan, legnagyobb mennyiségben a vesében és a májban expresszálódik [273].

Az eddigi placenta-fehérjékhez hasonló módszerekkel a **PP23** fehérjéről bebizonyítottuk, hogy azonos a 28 kDa molekulatömegű humán SOUL protein (más néven: heme binding protein 2) fehérjével, amit proteomikai vizsgálata is alátámasztott (azonosítási szám #: NP_055135). Mind az izolált, mind a rekombináns PP23 köti a vas(II)-t és kötődik a hem-hez. A placentához képest sokkal nagyobb mennyiségben termelődik a különböző tumoros szövetekben, így pl. hasnyálmirigy adenokarcinómás szövetben. Vizsgálataink szerint a PP23 szerepet játszhat különböző apoptotikus folyamatokban, valamint a magzati differenciálódásban, fejlődésben.

A **PP25** fehérjét először szintén méhlepényből izolálták. Génjének szekvenciája hasonlóságot mutatott az alfa-B-krisztallin-hoz, mely nagyon hasonló szekvenciájú több „kis hősokk fehérje” szerkezetéhez. A hőstresszre való érzékenysége, ill. chaperon aktivitása bizonyította, hogy ez a fehérje is egy „kis hősokk fehérje” és molekulatömege után Hsp16.2-nek nevezték el. Ez a fehérje is nagyobb mennyiségben expresszálódik tumoros szövetekben (pl. neuroektodermális tumor). Rekombináns Hsp16.2 stabilizálta a mitokondriális membránt. Hsp16.2 túltermelő sejteknek megnőtt az életképességük sejthalált indukáló szerekkel szemben. HeLa és WRL-68 sejtek lizátumából rekombináns Hsp16.2-vel készített immunaffinitás oszloppal kihalászott legnagyobb mennyiségű fehérjét proteomikai módszerrel azonosítottuk és MALDI-TOF MS „peptid tömeg térképezés” módszerrel, ill. PSD MS/MS spektrumok alapján humán hősokk 90 kDa fehérje 1 bétának (azonosítási # NP_031381) találtuk. Ez további kutatásokat indukált és kimutatták, hogy védőhatását Hsp90-mediált útvonalon fejt ki. Hsp16.2 túltermelő sejtekben megnőtt a lipid raft-ok képződése, melyben a Hsp90-nek ismert szerepe van [274].

4.5.2. A mitokondrium esszenciális jellegének igazolása [XLIII]

A mitokondrium nélkülözhetetlen organeluma az eukarióta sejteknek. Anabolikus és katabolikus reakciók egész sorának végrehajtásában játszik fontos szerepet: a citrátkör és a terminális oxidáció mellett itt zajlik például a zsírsavak béta-oxidációja, az urea ciklus, aminosav bioszintézis, valamint a hem szintézis néhány lépése, ezen kívül fontos szerepe van jelátviteli folyamatokban és az apoptózis szabályozásában is [275]. Érdekes módon ezen funkciók egyike sem esszenciális: a légzési lánc, az ATP termelés, avagy a számos bioszintetikus reakció elvesztését követően pl. az élesztő sejtek megfelelő környezetben képesek tovább élni [276]. A legelső és a sokáig egyetlen ismert és nélkülözhetetlen mitokondriális funkció a vas-kén fehérjék aktivációjához szükséges vas-kén komplex bioszintézise [277]. Az azonban nem volt ismert, hogy miért teszi ez a funkciója a mitokondriumot az eukarióta sejtek elengedhetetlen alkotórészévé. Úgy gondoltuk, hogy a mitokondrium egy vagy több pótolhatatlan funkciót betöltő extramitokondriális vas-kén fehérje aktivációjával válik létfontosságú sejtalkotóvá.

Kutatásainkhoz tehát egy olyan élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) célfehérjét kerestünk, amely valószínűleg vas-kén fehérje, az élesztőben bizonyítottan esszenciális, de alapvető szerepe még nem tisztázott. A fehérje adatbankok átvizsgálása után az addig ismeretlen funkciójú **Rli1p**-re esett a választásunk. Ez a fehérje egyike az evolúció során legerősebben konzerválódott fehérjéknek, látszólag minden archeában és eukariótában megtalálható. Együttműködő partnereim bebizonyították, hogy az Rli1p prosztetikus csoportként vas-kén komplexet köt, viszont ellentétben a többi ismert esszenciális vas-kén fehérjével, nincs szerepe a vas-kén komplex bioszintézisében. Így ez a fehérje, funkciójának feltárásán keresztül megfelelő jelölt lett annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy miért nélkülözhetetlen a mitokondrium az eukarióta sejtek számára.

Az Rli1p funkciójának megértéséhez elengedhetetlenül fontos megvizsgálni, milyen további fehérjékkel kapcsolódik a sejten belül. A lehetséges kötő partnerek izolálására affinitáskromatográfiát, azonosításukra proteomikai módszereket alkalmaztunk.

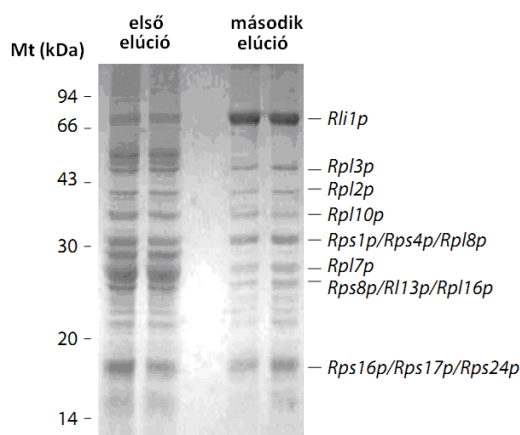
Kísérletek

A Rli1p-hez kötődő fehérjék kinyerésére a kofrakcionálás egyik formáját, a TAP-tag (Tandem Affinity Purification) affinitás kromatográfiás módszert alkalmaztuk, amely egy általánosan használt eljárás TAP-tag-gel ellátott fehérjék és az általuk képzett komplexek natív körülmények közötti hatékony és nagy tisztaságú izolálására [278]. A TAP-tag két alkotója a protein-A és a kalmodulin-kötő fehérje, amelyeket a dohánymozoik vírus (DMV)

proteáz hasítóhelye választ el egymástól. A kísérlethez egy olyan törzset hoztunk létre, amelyben az RLI1 génjéhez TAP-tag-et kapcsoltunk, miközben a gén továbbra is saját endogén promóterének szabályozása alatt állt (RLI1-TAP törzs). A kétlépéses affinitás kromatográfiás módszer során az élesztősejt extraktumát először IgG-affinitás oszlop, majd DMV proteáz hasítást követően kalmodulin-affinitás oszlop használatával tisztítottuk. Az Rli1-TAP fehérjét és a hozzá kötődő fehérjéket ezután SDS-PAGE segítségével szétválasztottuk. A legnagyobb mennyiségben jelenlévő fehérjéket gélben történt emésztés után MALDI-TOF tömegspektrométeren végzett „peptid tömeg térképezés” módszerével, az MS-Fit szoftverrel (UCSF; <http://prospector.ucsf.edu/>) nrNCBI adatbázisban történt kereséssel azonosítottuk. Az MS spektrumban legintenzívebb két csúcsot adó peptidjének szekvenciáját PSD MS/MS segítségével határoztuk meg.

Eredmények és megbeszélésük

A TAP-tag affinitás kromatográfia óriási előnye más izoláló módszerekkel szemben egyrészt a kétlépéses tisztítás, amellyel még specifikusabb és megbízhatóbb módon tisztíthatók a TAP-tag-et hordozó fehérjék kötő partnerei, valamint a natív viszonyokat imitáló körülmények, amelyek lehetővé teszik, hogy az *in vivo* asszociációk a tisztítási lépések folyamán megmaradjanak. Az SDS-PAGE elektroferogramon látható, hogy az TAP-tag-s tisztítás első lépésében még sok, kisebb affinitással kötődő fehérje eltávolítása jóval tisztábbá teszi a képet (59. ábra).



59. ábra

Rli1p-vel kölcsönható fehérjék TAP-tag affinitáskromatográfiás tisztításának elektroferogramja,
ill. a proteomikai módszerrel azonosított fehérjék elhelyezkedése
SDS-PAGE 12% gél, festés CBB R-250

dc_272_11

Az Rli1p-n kívül csak riboszómális fehérjéket, a kis (40S) és nagy (S60) alegységek alkotóit mutattunk ki (nagy találati pontszámmal: Mowse pont) (12. Táblázat), ami azt jelenti, hogy a Rli1p a 80S citoszólikus riboszómához kötődik.

12. Táblázat

Rli1p-vel kölcsönható fehérjék MALDI-TOF tömegspektrometriás azonosításának eredményei

Fehérje neve	Azonosító #	Molekulatömeg	Lefedettség %	Mowse pont
Rpl1p	NP_010376	68341	41	1,303e+008
Rpl3p	NP_014706	43758	45	2,331e+006
Rpl4ap	NP_009587	39092	52	1,241e+006
Rpl4bp	NP_010295	39062	52	7,992e+005
Rpl2bp	AAA34974	39125	40	4,899e+004
Rpl10p	NP_013444	33718	38	3,216e+005
Rps1bp	NP_013648	28813	53	7,260e+005
Rps1ap	NP_013546	28744	48	2,192e+005
Rps4bp	NP_012073	29410	44	2,029e+004
Rps4ap	NP_012679	29410	44	2,029e+004
Rpl8bp	NP_013055	28112	38	1,0e+000*
Rpl7ap	NP_011439	27638	63	6,065e+005
Rpl7bp	NP_015126	27697	59	2,296e+005
Rpl16ap	NP_012133	22201	26	3,6e-001*
Rps8ap	NP_009481	22490	42	2406
Rps8bp	NP_011028	22490	42	2406
Rpl13bp	NP_013862	22525	40	2039
Rpl13ap	NP_010201	22554	40	2036
Rps17ap	NP_013688	15788	43	5,0e-001*
Rps16bp	NP_010200	15847	34	3,2e-001*
Rps24ap	NP_010997	15329	39	3,2e-001*

Az eredmények igazolására a kísérletben használt törzs sejtextraktumát cukorgradiens ultracentrifugálással elválasztották és az egyes frakciókat Western blot-tal vizsgálták Rli1p-TAP, Rps3p, Rpl10p fehérjékre. A kísérlet eredménye megerősítette eddigi megfigyeléseinket, hogy bár az Rli1p legnagyobb része a kis riboszómális alegységhez kötődik, a fehérje mindkét alegységgel, valamint a kész 80S riboszómával is képes kapcsolódni.

Az itt ismertetett, a Rli1p-vel kölcsönható fehérjék azonosítása része volt egy nagyobb, az Rli1p tulajdonságait kutató kísérletsorozatnak. Vizsgálataink során bebizonyítottuk, hogy az élesztő Rli1 fehérje alapvető szerepet játszik a riboszómák érésében. Mindez a mitokondrium esszenciális jellegét is megmagyarázza, hiszen ez az organelum a vas-kén komplex szintézise által egy olyan vas-kén fehérjét aktivál, amely a riboszómák érésének elősegítésén keresztül elengedhetetlen a fehérjeszintézishez.

4.5.3. Barna zsírszövet fehérjéinek proteomikai analízise [XLIV]

Az emlősök testhőmérsékletének szabályozására többfajta mechanizmus működik. Ezek egyike a hőmérséklet által szabályozott hőtermelés. Ennek helyszíne állatokban (rágcsálók, medve) és újszülöttekben a barna zsírszövet („brown adipose tissue”, BAT) [279]. Feladata ellentétes a fehér zsírszövetével („white adipose tissue”, WAT), mert a BAT inkább az energia felhasználásáért, hővé alakításáért, míg a WAT az energia zsír formájában történő tárolásáért felelős. Hideghez való alkalmazkodáskor a BAT mennyisége megnő, működése intenzívvé válik, reakklimatizáláskor ellentétes folyamat indul be [280]. Más sejtekkel (beleértve a WAT-ot is) szemben a BAT mitokondriális ún. szétkapcsoló fehérjét („uncoupling protein 1”, UCP1) termel, ami megadja a sejt mitokondriumának a lehetőséget arra, hogy lekapcsolja az oxidatív foszforilációt és a szubsztrátot ATP előállítás helyett hőtermelésre használja fel. Több közlemény foglalkozott az UCP1 génexpressziójának tanulmányozásával, de kevés információ volt a BAT, ill. WAT hideg-indukálta mitokondriális biogenezisének molekuláris szintű történéseiről [281]. Munkánk alapvető célkitűzése volt először megismerni, hogy milyen fehérjeszintű változások történnek hidegstressznek kitett, majd reakklimatizált állatokban, ill., hogy a megváltozott expressziójú fehérjék (enzimek) hatására milyen folyamatok történnek.

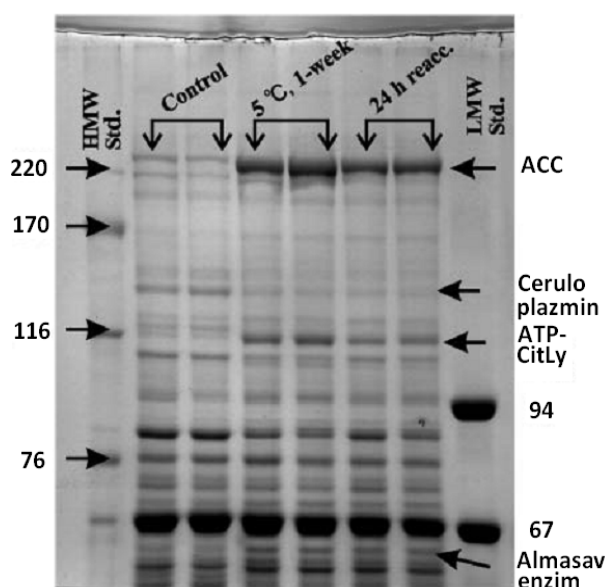
Kísérletek

A 29 °C-on tartott hím patkányokat 7 napra +5 °C-ra hűtött helyre tettünk, majd ismét 29 °C-ra visszahelyezve 24 és 48 óra múlva SDS-PAGE futtatással összehasonlítottuk a BAT fehérje-összetételének változását a kontrolléhoz viszonyítva. A megváltozott expressziójú fehérjéket redukálás, alkilezés és tripszines emésztés után MALDI-TOF tömegspektrométerrel „peptid tömeg térképezés” és PSD MS/MS módszerekkel és a MASCOT szoftverrel (Matrix Science Inc. USA) azonosítottuk.

Eredmények és megbeszélésük

A hideg adaptációra megnövekedett expressziójú fehérjéket proteomikai módszerekkel azonosítottuk és többségük lipogenikus enzimnek bizonyult (60. ábra, 13. Táblázat). További kísérletekhez az acetil-koenzim A karboxilázt (ACC) és a ATP-citrát liázt (ATP-CitLy) választották. A fehérjéket specifikus antitestek használatával Western blot kísérletben validálták. Érdekes még NADH szintézisét katalizáló almasav-enzim mennyiségének fokozódása, ami nélkülözhetetlen koenzimje a *de novo* zsírsavszintézisnek. Az emelkedett ACC és CitLy aktivitások barna zsírszövetben, hideg környezetben erőteljes zsírsavszintézisre

utalnak. Ezzel ellentétben a zsírszintézis fenti két kulcsenzimjének aktivitása a fehér zsírszövetben csökkent. Az enzimaktivitások további vizsgálata egyértelműen kimutatta, hogy a két enzim a barna és fehér zsírszövetben ellentétesen szabályozott, ami megmagyarázza Trayhurn eredményeit [282]. Az emelkedett zsírsavszintézis mellett a barna zsírszövetben hidegben sokkal jelentősebb a β -oxidáció, amire a zsírtartalom mérése adta az indirekt bizonyítékot. A glükóz (és a glikogén) a BAT-ban jó szubsztrátja mind a hőtermelésnek, mind a lipogenezisnek.



60. ábra

Barna zsírszövet fehérje-összetétele SDS-PAGE-val
SDS-PAGE: 5% poliakrilamid

Fehérje neve	Azonosító #	Mt	%	Pont szám
acetyl-CoA karboxiláz 1	NP_071529	266849	40	143
ceruloplazmin	NP_036664	120841	26	70
ATP citrát liáz	NP_058683	121471	38	213
Almasav-enzim	P13697	64589	47	120
Enoláz 1	AAH63174	51736	48	150

13. Táblázat

Hidegadaptációban megnövekedett expressziójú
fehérjék azonosítása MALDI-TOF
tömegspektrometriával

Kísérleteinkkel választ tudtunk adni egy korábbi kérdésre is [283], hogy miért növekszik meg a barna zsírszövet glikogén-koncentrációja a reakklimatizálódás során.

4.5.4. Transzglutamináz enzim szubsztrátjainak proteomikai meghatározása [XLV]

A transzglutaminázok (EC 2.3.2.13) egy aciltranszfer reakciót katalizálnak, melyben a fehérjeszubsztrát peptidlánca glutamin aminosavának γ -karboxamid csoportja acil-donorként, a lizin ϵ -aminocsoportja acil-akceptorként funkcionál. A reakció eredménye egy intermolekuláris $\epsilon(\gamma$ -glutamil)lizin izopeptid kötés, amely összekapcsolja a fehérjék láncait [284]. Transzamináz szubsztrátjának bizonyult az intracelluláris β -krisztallin [285], lipokortin [286] és számos extracelluláris fehérje [287]. A programozott sejthalál vizsgálata során az aktin működött az enzim szubsztrátjaként.

Az olyan komplex folyamatok, mint a programozott sejthalál tanulmányozására, gyakran alkalmazzák a fejlődési genetikai vizsgálatok kedvenc állatmodelljét, a *Caenorhabditis elegans* fonalférget [288]. Transzglutamináz aktivitást lehetett mérni a féreg extraktumában és feltételezték, hogy a reakció szerepet játszik a programozott sejthalál folyamatában [289].

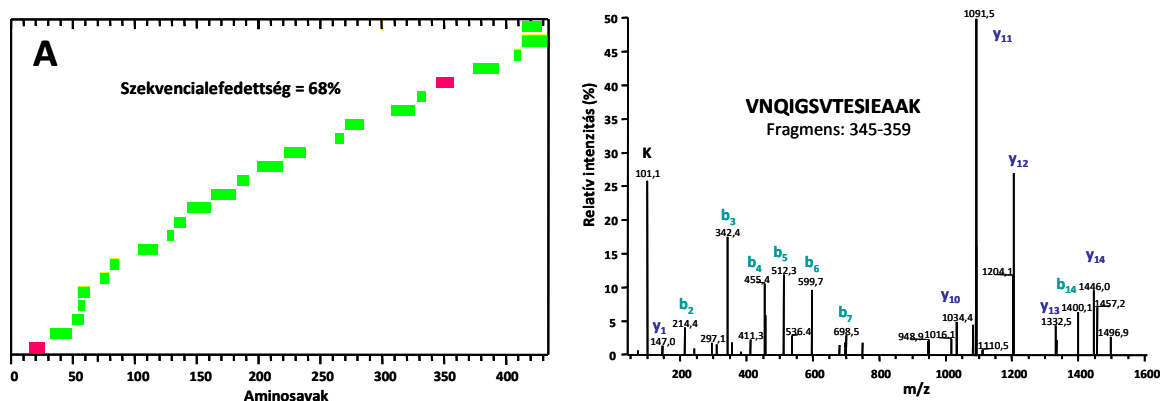
Célunk az enzim szubsztrátjának *C.elegans*-ból történő azonosítása volt.

Kísérletek

Agar-agar gélen nevelt *Caenorhabditis elegans* fonalféreg homogenizátumát N-(5-aminopentil)biotinamiddal inkubáltuk, majd a preparatív SDS-PAGE-vel tisztítottuk. A biotin-aktív frakciókat avidin-Sepharose oszlopon kromatografáltuk, majd 2D elektroforézissel tovább tisztítottuk. A biotin-aktív foltokat kivágás után DTT-vel redukáltuk, jódetamiddal alkileztük, majd 37 °C tripszinnel hidrolizáltuk. A peptideket saját készítésű 300 µm x 150 mm C18 (300 Å, 5 µm) kapilláris oszlopon 0,1% hangyasav (vízben) – 0,1% hangyasav (acetonitrilben) gradienssel ~ 1 µL/perc áramlási sebességgel választottuk szét, majd az online kapcsolt TSQ-7000 tömegspektrométerrel analizáltuk. Az eredmények bioinformatikai kiértékelése a ProFound szoftverrel (<http://prowl/rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound>) és az aktuális SwissProt fehérjeadatbázis használatával történt.

Eredmények és megbeszélésük

A 2D gélen ezüsfestéssel több, de streptavidines reakcióval csak két erősen festődő foltot mutattunk ki. „Peptid tömeg térképezés”-sel az egyik folt 68% szekvencialefedettséggel enoláznak (CE03684) (61. ábra), míg a másik fehérje 56% lefedettséggel mitokondriális ATP-szintáz alfa-1 alegységnek (CE18826) bizonyult.



61. ábra

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

A fehérjék azonosításának biztonságát két, ill. 3 peptidjük MS/MS analízisével támasztottuk alá. Az 1. fehérjéből származó 1448,5 Da tömegű csúcs szekvenciája GNPTVEVDLFTEK, a 1545,4 Da tömegűé VNQIGSVTESIEAAK, melyek az enoláz 16-26 és 345-359 szekvenciái. A 2. folt TAIADTIINQK (1299,7 Da), HALIIFDDLK (m/z 1270) és QMSLLLR (m/z 859,5) peptidjei a mitokondriális ATP-szintáz alfa-1 alegység 204-215, 291-301 és 308-314 fragmensei. A fehérjéket a fereg petéjén és fejlődési ciklusának első állapotán kívül a többi fejlődési fázisban kimutattuk.

A két enzim azonosítása további kísérletek kiindulópontjául szolgált [290].

4.6. A PROTEOMIKA GYÓGYSZERKUTATÁSI ALKALMAZÁSA

Az utóbbi 20-25 évben a gyógyszerkutatásban paradigmaváltás játszódott le [291]. A hagyományos gyógyszerkutatási stratégiák több száz, több ezer természetes vagy szintetikus vegyület szűrésével először a megcélzott biológiai hatással rendelkező vegyületeket, azaz a valószínű hatóanyagot választották ki. Miután a kellő terápiás értékkel rendelkező vezérvegyületet kiválasztották, szerkezeti módosításokkal, a szerkezet-hatás összefüggések megismerésével optimalizálták a vegyületet. Azonban magáról a betegségről, amivel szemben a gyógyszert tervezték, rendszerint keveset tudtak. Az elmúlt időszakban a molekuláris biológia, biokémia és a fehérjekémia eredményeire építve alapvető áttörés következett be a legfontosabb betegségek molekuláris mechanizmusainak megismerésében és ezek az eredmények új perspektívákat nyitottak a gyógyszerkutatás számára is. A racionális gyógyszertervezéshez először a betegség okát, molekuláris mechanizmusát derítik fel, majd a beazonosított és molekuláris biológiai módszerekkel igazolt, szerkezetileg (3D) feltérképezett „betegségokozó” célmolekulák ellen történik célzott hatóanyag-keresés, tervezés, optimálás, majd a gyógyszerfejlesztés. A kismolekulájú gyógyszerek célpontjai az esetek túlnyomó többségében fehérjék: enzimek, G-protein-kapcsolt receptorok, ioncsatorna-alkotók, transzporterek, magi hormonreceptorok stb. [292]. Az ember több tíz-, százezer fehérjéje közül azonban csak töredékük „druggable”, azaz célpontja a gyógyszer serkentő vagy gátló hatásának.

A kilencvenes évek végéig mintegy 500 fehérjéről „mutatták ki”, hogy gyógyszerek célpontjai és kb. 10000-ről feltételezték, hogy potenciálisan azok lehetnek [293]. Később ez a szám csökkent [294], de vannak akik más szempontok alapján ezt a számot nagyobbra teszik [295]. Tipikusan célpontok azok a fehérjék, amelyek kulcsszerepet töltenek be olyan

metabolikus, jeltovábbítási és más biokémiai folyamatokban, melyek jellemzőek egy adott betegségre, ill. mikrobiális patogének fertőzőképességére vagy túlélésére.

A proteomika a fehérjék szerkezetének, poszt-transzlációs állapotának, mennyiségi és minőségi változásainak, sejtbeli lokalizációjának, molekuláris kölcsönhatásainak és funkcióinak meghatározásával foglalkozik, mely elősegíti szervezeten belüli biológiai útvonalak, hálózatok, jelátviteli mechanizmusok felderítését és megértését, betegségek molekuláris patomechanizmusának megismerését, betegségek és terápiájuk biomarkereinek feltérképezését stb. A proteomikának a gyógyszerkutatás/fejlesztés minden fázisában (célpont felfedezése, azonosítása, validálása, vezérvegyület kiválasztása, optimalása, gyógyszerfejlesztési jelölt kiválasztása, preklinikai/klinikai vizsgálatok) megvan a saját alkalmazási területe.

Gyógyszerek potenciális célfehérjéinek kijelölésére számos módszert alkalmaznak [296]. Beteg és normál sejtekben, szövetekben eltérő expressziójának talált fehérjék azonosítása, kölcsönhatási hálózatainak meghatározása gyakran az első lépcsőfok annak eldöntésében, hogy egy-egy fehérje jó gyógyszer-célpont lehet-e. A kismolekulájú gyógyszerrel kapcsolatba lépő, ahhoz kötődő fehérjék meghatározása is vezethet molekuláris célpont kijelöléséhez. Egy hatóanyaggal kezelt és nem kezelt minták fehérjeprofíljaik összehasonlítása felvilágosítással szolgálhat a gyógyszer hatásmechanizmusának meghatározására mind a fő, mind a mellékhatások tekintetében.

A proteomika egyik legfontosabb alkalmazási területe a biomarkerek, biomarker panelek felderítése és nyomonkövetése [XLVI]. A klinikai gyakorlatban a biomarkerek jelezhetik a betegség kockázatát (prediktív biomarkerek), utalhatnak a betegség kialakulására, meglétére, előrehaladottságára (diagnosztikus biomarkerek), és hogy az adott egyedi esetben hová fejlődhet a betegség (prognosztikus biomarkerek). Ezzel szemben a gyógyszerekkel kapcsolatos biomarkerek megmutathatják, hogyan dolgozza fel a beteg szervezete a gyógyszert (farmakodinamikai biomarkerek), segíthetnek annak megállapításában, hogy vajon a gyógyszer hatékony és biztonságos-e (toxikológiai biomarker), mi a biológiailag hatékony dózisa, és segíthetnek kiválasztani azon betegeket, akik a legnagyobb valószínűséggel válaszolnak a kezelésre, vagy legkevesbé szenvednek annak káros hatásaitól.

A proteomikának a gyógyszerkutatásban betöltött szerepét három példán, a szorongás, mint pszichiátriai kórkép mögött álló molekuláris folyamatok felderítésén, egy antitumor hatású peptid kölcsönható partnereinek azonosításán és egy nukleozid-analóg toxikus hatásának vizsgálatán keresztül mutatom be.

4.6.1. A szorongás egy állatmodelljének kifejlesztése és proteomikai jellemzése [XLVII]

A pszichiátriai betegségek (szorongás, depresszió) a központi idegrendszer megbetegedései. Mind gyakoriságukat, mind következményeiket tekintve ma már nagy népegészségügyi problémát jelentenek. A szorongásos kórképek a szervezet különböző ingerekre adott túlzott válaszreakcióinak következtében jönnek létre. Szinte minden esetben irracionális félelemmel és kóros szorongással járnak együtt. Jellemzőek rájuk a testi és lelki tünetek is. Tartós fennállásuk esetén és megfelelő kezelés nélkül a szorongás könnyen depresszióvá alakulhat. A legfőbb probléma ezen betegségek terápiájával kapcsolatosan, hogy a receptorokon ható jelenlegi gyógyszerek csak tüneti kezelésre alkalmasak, valamint sok mellékhatásuk van [297]. A szorongás az érzelem egyik megnyilvánulása, mely csak a magasabb rendű emlősök és az ember tulajdonsága. Humán betegségek kutatásához többnyire állatmodelleket használnak. A pszichiátriai betegségek modellezéséhez azonban az állatokat nem kérdezhetjük meg, hogyan érzik magukat, akarnak-e „beszélgetni”? A pszichiátriai betegségeknek olyan állatmodelljei vannak, amelyek az adott betegség egy-egy specifikus kulcstünetét vagy szimptomáját, de nem az egész szindrómát utánozzák [298]. A pszichiátriai neurobiológiai kutatások az utóbbi időben kiemelt jelentőséget tulajdonítanak a molekuláris jelenségek tanulmányozásának különféle pszichiátriai kórképekben és szindrómákban („molekuláris pszichiátria”) [299]. A betegség hatására bekövetkező sejtszintű molekuláris áthangolódás a genom illetve proteom megváltozásával jár, ami részben a szignálrendszerek közvetítésével, részben direkt génexpressziós hatásra következhet be. Állatkísérletekben megfigyelték, hogy anxiolitikus szer krónikus adása, ill. ismételten alkalmazott pszichoszociális stressz az agyi proteom megváltozásával jár [300, 301].

Az EGIS Gyógyszergyár Rt. által rendelkezésünkre bocsátott, 35 generáción keresztül tesztelt és válogatott beltenyésztett „szorongó” egértörzs (AX) felhasználásával azonosítani akartuk az agy azon génjeit és fehérjéit, amelyek a normál egértörzshöz (NAX) képest (a két törzs egyedei tenyésztés elején azonos szülőktől származtak) eltérő szinten fejeződnek ki. Az eredményekből következtetni kívántunk arra, hogy a szorongás milyen molekuláris folyamatokat érint, amelyek esetleg alkalmasak lesznek racionális gyógyszertervezésre.

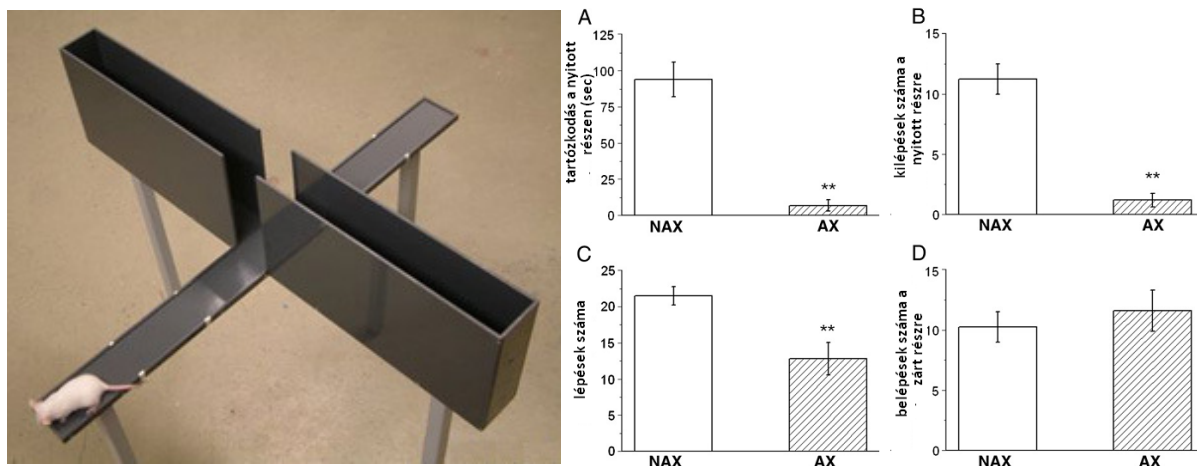
Kísérletek

Az állatok viselkedését háromféle teszttel, a „porond” („open-field”), az „emelt keresztlabirintus” („elevated plus maze”) és a „fény-sötét” („light-dark”) tesztekkel tanulmányoztuk. 15-17 hetes AX és NAX egerek agyát kivettük, a kisagyat, az agytörzset és a bulbus olfactoriust eltávolítottuk. Az agy többi részét homogenizáltuk, majd a fehérjét 2D

DIGE (differenciális fluoreszcens gélelektroforézis) módszerrel elválasztottuk és mennyiségüket analizáltuk. A különböző fluoreszcens festékekkel megjelölt AX, NAX és referencia mintákat (a két csoport 1:1 arányú elegye) összekevertük és együttesen analizáltuk. A gélekben elválasztott fehérjéket Typhoon TRIO+ (GE HealthCare) lézer-szkennerral vizualizáltuk és digitalizáltuk, a csoportok fehérjeprofíljait DeCyder szoftverrel hasonlítottuk össze. Az eltérő intenzitású foltokat kivágva a fehérjéket tripszines hidrolízist követően online kapcsolt nanoHPLC-MS/MS rendszerrel (75 x 150 mm ZORBAX 300SB-C18 oszlop + 300 µm x 5 mm C18 csapda-oszlop, 0,1% hangyasav-víz-acetonitril gradiens elúció, áramlási sebesség: 300 nl/perc, Agilent LC-MSD XCT Plus ioncsapdás tömegspektrométer: full-scan MS, majd a négy legintenzívebb ionból MS/MS). A tömegspektrometriás adatokból a fehérjéket MASCOT, ill. X! Tandem szoftverek és az aktuális SwissProt adatbázis segítségével azonosítottuk.

Eredmények és megbeszélésük

A pszichiátriai betegségek komplex megbetegedések, melyek kialakulását számos környezeti faktor befolyásolja [302]. A megfelelő állatmodell kiválasztása meghatározza az egész kísérlet kimenetelét. A kitenyésztett stressz-érzékeny „szorongó” egerekben 35 generáción keresztül öröklődött ez a viselkedési mintázat, ami homogén genommal és hasonló (azonos) fenotípussal rendelkező állatcsoportokhoz vezetett. Kimutattuk, hogy „emelt keresztlabirintus” tesztben jelentős eltérés van az AX és NAX egércsoportok viselkedése között (62. ábra).



62. ábra

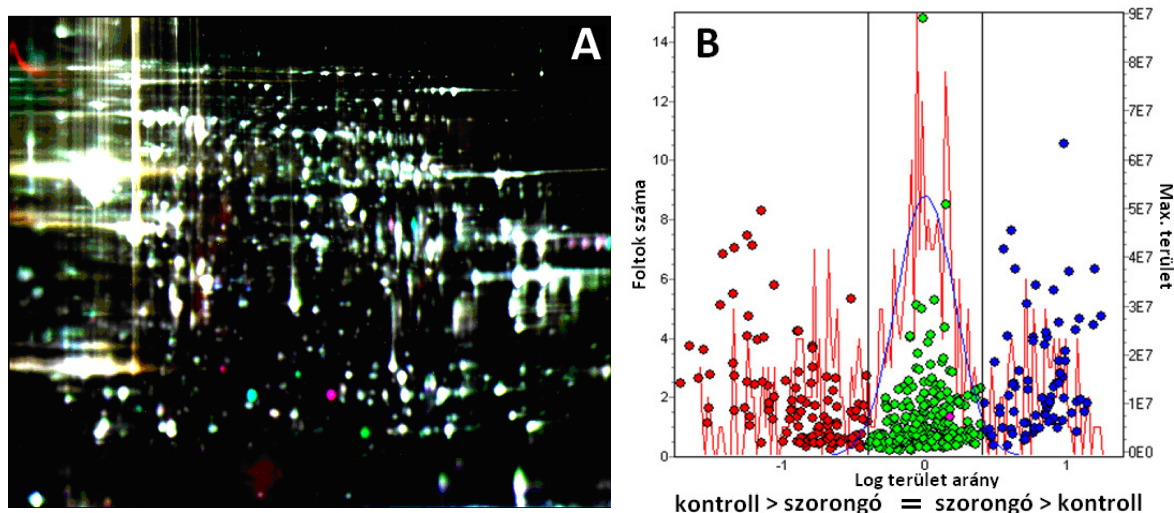
Az „emelt keresztlabirintus” (bal oldal) és az AX és NAX egerek viselkedési paraméterei (jobb oldal)
 A nyitott részen való tartózkodás ideje (A), a nyitott részre való kilépések száma (B),
 az összes kilépés száma (C), zárt részre való belépések száma (D)

Újdonság a mi megközelítésünkben, hogy a szorongó fenotípusú törzset proteomikai módszerekkel jellemezzük. Ez jelentős előrelépést jelent, mert – bár a pszichiátriai betegségek viselkedési modelljei nem közvetlenül egyenértékűek, de hasonlóak a humán kedélybetegségekhez – a gyógyszerfejlesztésben elért sikerek bizonyítják, hogy még a rágszáló modellek is reprodukálják a humán betegségek jó néhány molekuláris szintű történetét [303].

Az előzők alapján azt szeretnénk volna elérni, hogy reprodukáljuk és jelentősen kibővítsük a szorongás már ismert molekuláris mechanizmusairól szóló ismereteket.

Meg kell jegyezni, hogy bár a 2D-DIGE módszerrel csak a sejtekben lévő legnagyobb koncentrációjú fehérjék 5-25%-át tudjuk detektálni, az 1500-2500 fehérje megfelelően karakterizálja az állatmodell fenotípusát. A két egércsoport között 2D-DIGE alapján (63/A. ábra) 82 eltérő intenzitású foltot találtunk ($p < 0,05$, $n = 6/\text{csoport}$), melyek közül 39 az AX csoportban, míg 43 a NAX csoportban volt intenzívebb (63/B. ábra). Az azonosított fehérjék adatait a Függelék 7. táblázata tartalmazza.

A 82 fehérjéből 31 már ismert volt a szorongás folyamatában való részvételéről, amelyek egy része a szerotoninerg neurotranszmisszióval kapcsolatos [304], azonban 51 fehérje még új a szorongás irodalmában. Ezek tanulmányozása új kutatásokat indíthat, de az is lehet, hogy egyszerűen az állatmodell és a humán betegség közötti molekuláris eltéréseket jelzik, amelynek eldöntése szintén további vizsgálatok tárgya.



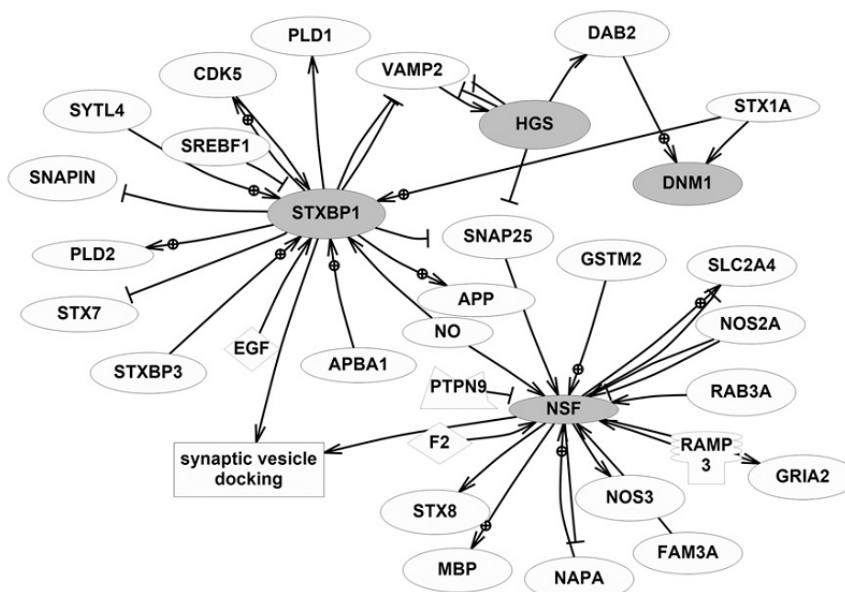
63. ábra

Reprezentatív 2D DIGE kép (A), ill. változó intenzitású foltok megoszlása (B)
IEF: 24 cm pH 3-10 NL IPG, PAGE: 24 x 20 cm 10 % poliakrilamid gél, minták előkezelése Cy3 és Cy5 ,
referencia Cy2 fluoreszcens festékkel

Az eltérően expresszáldott fehérjéket 11 funkcionális csoportba osztottuk és a csoportokat sárga színnel jeleztük a Függelék 7. táblázatában. Az adatatokból látható, hogy szorongás modelljében sok életfolyamat érintve van. Jelentős csökkenést találtunk a jelátvitelben működő fehérjék és gén-transzkripció faktorok tekintetében. A szénhidrát-metabolizmus vonatkozásában – ami az idegsejtek rendkívül fontos és érzékeny funkciója [305] –, specifikus változásokat találtunk. Megváltozott aminosav- (köztük a glutaminsav is) és nukleinsav-metabolizmusra utaló fehérjék is voltak a listában. A szorongás által befolyásolt agy szénhidrát-, aminosav- és nukleinsavmetabolizmusának általunk azonosított fehérjei között könnyen új biomarkert találhatunk, mint az a glioxaláz esetében már megtörtént [306]. Az oxidatív stressz folyamataihoz tartozó fehérjék szintjében is detektáltunk eltéréseket. Fontos eredményünk, hogy az AX törzsünkben a szinaptikus fehérjék eltérő expressziója, melyek a szinaptikus dokkolásért felelősek. Ezzel párhuzamosan módosulások történtek a citoskeletális fehérjék mennyiségében, ami szintén újdonságnak tekinthető. Kollégáim az Ariadne Genomics Pathway Studio szoftver segítségével (amely irodalmi adatok alapján térképezi fel egy-egy folyamatban kölcsönható fehérjéket) felrajzolták a szinaptikus dokkolásban szepet játszó fehérjék működési hálózatát (64. ábra). A négy általam azonosított, az AX egerekben megváltozott expressziójú fehérjéhez (dinamin 1, hepatocita növekedési faktor-regulált tirozin kináz szubsztrát, N-etilmaleimid-érzékeny faktor, szintaxin kötő protein 1) az irodalom szerint sok más fehérje kapcsolódik, így ezek a hálózatban központi szerepet játszanak.

Összefoglalva: eredményeink szerint az eddig ismert szerotonin-receptor vonalon túl, szorongás hatására változások történnek a szénhidrát-metabolizmus, a sejten belüli redox rendszer és a szinaptikus dokkolás folyamataiban is. Az érintett fehérjék között várhatóan új biomarker fehérjék és gyógyszercélpontok lehetnek.

Meg kell jegyeznem, hogy ugyanennek a két törzsből (AX, NAX) származó állatok agyából származó mintákban (frontális kéreg, hippocampus) meghatároztuk a transzkriptom változásait is [XLVIII]. A gének funkcionális analízise azt mutatta, hogy a szorongás transzkriptom szinten is számos biológiai funkciót érint, úgymint fémion transzport, különböző jelátviteli mechanizmusok, az idegrendszer fejlődése, szinaptikus transzmisszió stb.), amelyek közül találunk olyan folyamatokat is, amik proteom szintjén is megváltoztak. Eredményeink ismét igazolták azt, hogy a transzkriptom szintjén bekövetkező változásokat fenntartással kell kezelni, mert jelentős részük nem manifesztálódik fehérjeexpresszió-változásban [193].



64. ábra

AX egérben megváltozott expresszójú (szürke), a szinaptikus dokkolásban szerepet játszó fehérjék hálózata. A hálózat azokat a fehérjéket is mutatja (fehér), amelyek közvetlenül kapcsolódnak a szorongás által érintett fehérjékkel. Rövidítések: szürkék: DNM1 – dinamin 1, HGS – hepatocita növekedési faktor-regulált tirozin kináz szubsztrát, NSF – N-etilmaleimid-érzékeny faktor, STXBP1 – szintaxin kötő protein 1,

fehérek : APBA1 – amiloid béta (A4) prekursor fehérje kötő, család A, tag 1, APP – amiloid béta (A4) prekursor protein (peptidáz nexin-II, Alzheimer-kór), CDK5 – ciklin-függő kináz 5, DAB2 – disabled homológ 2, mitogén-érzékeny foszoprotein, EGF – epidermális növekedési faktor, EGR1 – korai növekedési válasz protein, F2 – koagulációs faktor II, FAM3A – család szekvencia hasonlósággal 3, tag A, GRIA2 – glutamát receptor, ionotróp, AMPA 2, GSTM2 – glutation S-transzferáz M2 (izom), MAPK1 – mitogén aktivált protein kináz 1, MBP – myelin basic protein, NAPA – N-etilmaleimid-szenzitív faktor csatolt protein, alfa, NO – nitrogén monoxid, NOS2A – nitrogén monoxid szintáz 2A, NOS3 – nitrogén monoxid szintáz 3, PLD1 – foszfolipáz D1, PLD2 – foszfolipáz D2, PTPN9 – fehérje tirozin foszfatáz, nem-receptor típusú 9, RAB3A – RAS onkogén család tagja, RAMP3 – receptor (G protein-kapcsolt) aktivitásmódosító fehérje 3, SLC2A4 – oldott anyag szállító család 2 (glükóz transzporter), tag 4, SNAP25 – szinaptoszómális-asszociált fehérje, 25 kDa, SNAPIN – SNAP-asszociált protein, SREBF1 – szterol szabályzóelem-kötő transzkripció faktor 1, STX1A – szintaxin 1A (agy), STX7 – szintaxin 7, STX8 – szintaxin 8, SYTL4 szinaptotagmin-szerű fehérje 4 (granufilin-a), VAMP2 – vezikulum-asszociált fehérje.

4.6.2. Antitumor hatású peptidek célfehérjéinek azonosítása [XLIX-LI]

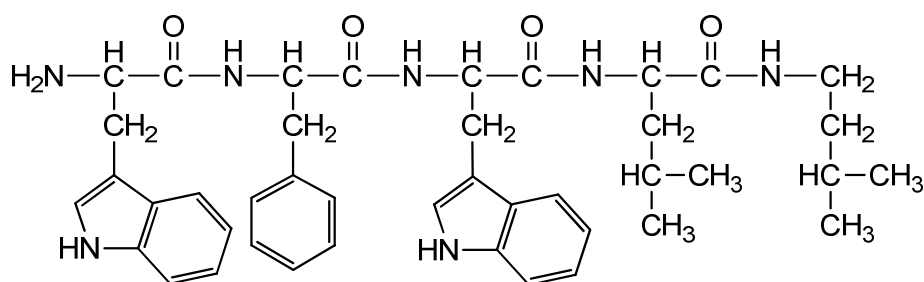
Orosz és mtsai olyan substance-P analógokat állítottak elő, amelyek mind *in vitro*, mind *in vivo* gátolták a kissejtes tüdőtumor (SCLC) fejlődését [307, 308]. A vezérvegyület fejlesztése és optimálása során molekuladinamikai számolásokat használva új, rövid láncú, az aktív centrumban csak három aminosavat tartalmazó peptideket terveztek. A szintetizált új vegyületek között is találtak hatékonyak peptideket, melyek hatásmechanizmusának tisztázásához meg akartuk határozni azokat a molekuláris célpontokat, amelyeken keresztül hatásukat kifejtik.

Kísérletek

A peptideket szilárdfázisú peptidszintézissel Boc-stratégiával, DCC/HOBt kapcsolással állították elő. Tumorellenes hatásukat MCI-H69, MCI-H82 (kissejtes tüdőkarcinóma), MDA-MB-231 (humán emlőkarcinóma) és HT-29 (humán vastagbél-tumor) sejtvonalakon, ill. kontrolként LL-24 normál tüdő fibroblaszton vizsgálták. A peptidek *in vivo* antitumor hatását csupasz egerekbe implantált H69 SCLC sejtekkel kialakított xenograftokon tanulmányozták. A peptid kötőfehérjéinek izolálásához a peptideket aktivált CH-Sepharose 4B-hez kapcsolták, majd a fenti sejtvonalak lizátumával inkubálták. A peptid-Sepharose-hoz kötődött fehérjéket eluálták, majd SDS-PAGE-vel elválasztották. A gélből kivágott fehérjesávokat redukció és alkilezés után tripszinnel hasítottuk. A képződött peptideket ZipTip C18 mikro oszlopon tisztítottuk, majd Bruker Reflex III MALDI-TOF tömegspektrométerrel analizáltuk. Az eredmények kiértékelésére az MS-Fit programot és az nrNCBI adatbázist használtuk.

Eredmények és megbeszélésük

A tervezett és szintetizált peptidek mindegyike Phe-D-Trp-Leu magot tartalmazta, melyet N-terminálison egy vagy két aminosavval, míg C-terminálison Leu-NH₂-dal vagy 1-amino-3-metilbutánnal (AMB) egészítettek ki. A leghatékonyabb peptidek közül a TCBL-136 (65. ábra) dózisfüggően gátolta a vizsgált sejtvonalak növekedését, míg az N-terminálison p-hidroxi-fenilalanint tartalmazó analóg (TCBL-145) csak a SCLC sejtvonalakon hatott.

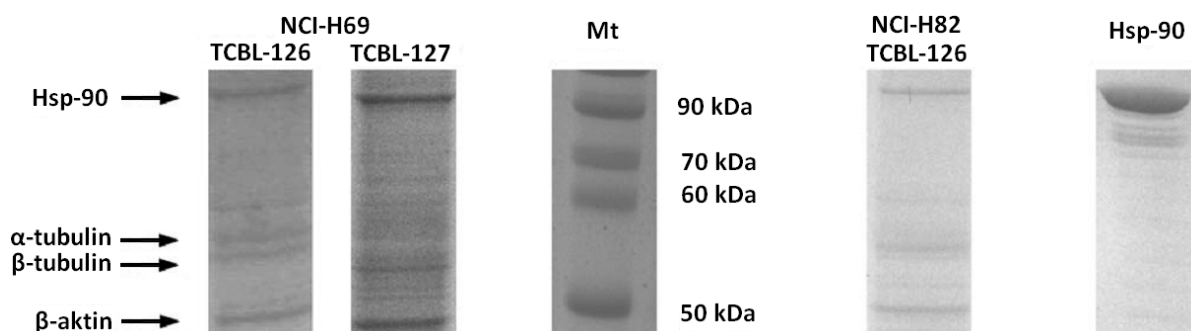


65. ábra

Antitumor hatású D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-AMB peptid (TCBL-136) szerkezete

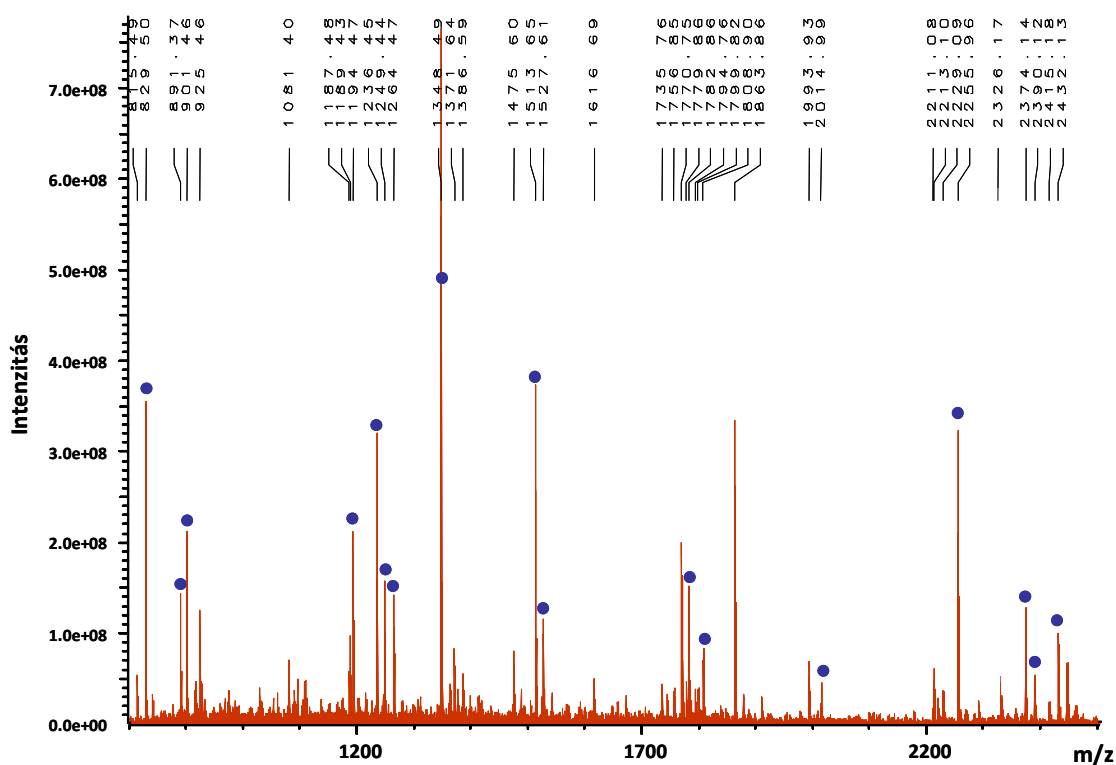
Az *in vivo* H69 SCLC xenograft tumorok növekedését a 1,5 mg/kg dózisban a TCBL-136 19%-ban, a TCBL-145 50%-ban gátolta. A vizsgált peptidek a kontrollhoz képest minimálisan gátolták a normál fibroblaszt növekedését, így feltételezhetően nincsenek hatással az egészséges sejtekre. NCI-H69 és NCI-H82 sejtek lizátumából TCBL-126, TCBL-

127, TCBL-142 vagy TCBL-136-t tartalmazó affinitásoszloppal „kihalászott” legnagyobb koncentrációjú fehérjéket MALDI-TOF „peptid tömeg térképezéssel” α - és β -tubulinnak, β -aktinnak és Hsp90-nek bizonyultak (66. ábra). A Hsp90-et (P08238) a 67. ábrán látható MALDI-TOF tömegspektrumból nagy találati pontszámmal (3.427×10^6) azonosítottuk.



66. ábra

TCBL peptidekhez kötődő fehérjék SDS-PAGE képe (10%-os gél, festés CBB R-250)



alakít ki kliens fehérjékkal, ezáltal az egész jeltovábbító mechanizmusra hatással van [311]. Chaperonok hatása nélkülözhetetlen a labilis szerkezetű fehérjék felgombolyodásához, stabilizálásához. A Hsp90 funkciójának farmakológiai gátlása jelentős szerephez juthat a daganatellenes terápiában [312]. Az eddig ismert inhibitorok mindegyike a Hsp90 N-terminálisán lévő ATP-kötőhelyhez kapcsolódik [313], ami a burjánzó sejtek kliensfehérjéinek szelektív degradációjához, majd a sejtek pusztulásához vezet [314]. Toxikus mellékhatásaik, rossz oldékonyságuk és kicsiny biohasznosulásuk miatt azonban az eddig ismert Hsp90 inhibitorok nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket. Az itt bemutatott peptidek pusztítják a különböző típusú daganatsejteket és eddig nem mutattak káros mellékhatásokat. Együttműködő partnereim igazolták, hogy ezek a peptidek dóziszfüggő módon gátolják a Hsp90 ATP-Sepharose-hoz való kapcsolódását, ami azt jelenti, hogy a megtervezett peptidek jól kötődnek a Hsp90 ATP-kötő zsebéhez. Reményeink szerint a ezek az új típusú Hsp90 inhibitorok új alternatívát nyújthatnak különböző tumoros betegségek terápiájában.

4.6.3. AIDS ellenes gyógyszer mellékhatásainak vizsgálata [LII]

Nukleozid analógok (didezoxinukleozidok) és az AZT (3'-azido-3'-dezoitimidin) hatékonyak a HIV vírussal szemben, így az AZT sokáig egyetlen szer volt az AIDS terápiájára [315]. A proteáz-inhibitorok bevezetése után kombinált terápiás formában továbbra is használatban vannak szinergikus antivírus hatásuk miatt. Azonban mind rövidtávú [316], mind hosszú távú használatkor [317] számos mellékhatásáról számoltak be: anémia, emésztőszervi rendellenességek, valamint miopátia, kardiomiopátia. Hosszú távú használatkor ezek a gyógyszerek gátolják a mitokondriális DNS-replikációt, ami az mtDNS csökkenéséhez vezet [318]. Az emlős mitokondriális genom a légzési lánc 13 fehérjét kódolja, ezért az mtDNS károsodása a sejt oxidatív energiatermelését, ATP szintézisét befolyásolja [319]. Kísérleteinkben a rövidtávú kezelésre bekövetkező biokémiai változásokra, azok mechanizmusára kerestük a választ.

Kísérletek

Fiatal (80-100 g) Wistar patkányok 1 mg/kg/nap ddC-t (didezoxicitidin) kaptak intraperitoneálisan két héten keresztül. Szívműködésüket folyamatosan monitorozták. A kezelés hatására történő változások vizsgálatához a teljes szívet és egy darab vázizmot használtunk. A nem részletezett biokémiai vizsgálatokon túl a vázizom fehérje-összetételében

bekövetkezett változásokat 1D poliakrilamid-gélelektroforézissel ellenőriztük. A ddC kezelés hatására eltűnő egyik fehérjesávot kivágva redukálást, alkilezést, majd tripszines proteolízist követően Finnigan TSQ-7000 tömegspektrométeren LC-MS/MS módszerrel analizáltuk.

Eredmények és megbeszélésük

Együttműködő partnereim biokémiai vizsgálatai kimutatták, hogy a ddC károsítja a szívizom és vázizom energia-metabolizmusát, csökkenti a mitokondriális enzimek aktivitását, de nem találtak általános meghibásodást a légzési komplexek komponenseinek szintézisében, nem mutattak ki lényegi változást a magi DNS fragmentációjában. A légzési komplexek szállítási és összekapcsolódási zavarára utal a Hsp72 és Hsp73 szintjének csökkenése. A ddC kezelés hatására jelentősen megnövekedett a reaktív oxigéngyökök (ROS) termelődése. A vázizom 1D-PAGE vizsgálata két fehérje jelentős csökkenését jelezte. A 16 kDa körüli sávban lévő fehérje Edman-szekvenálással mioglobinnak bizonyult, míg a 26 kDa körüli fehérjét „peptid tömeg térképezéssel” 54% szekvenciafedettséggel triózfoszfát-izomeráznak (m/z 26790 Da) találtuk. A fehérjeazonosítás valószínűségének növelése érdekében a két legintenzívebb kromatográfiás csúcsban lévő peptideknek (m/z 1319,5 és 1326,5) tandem tömegspektrometriás analízissel meghatároztuk a szekvenciáját. Az AIADNVKDWCK és IYGGVTGATCK peptidek megfelelnek a triózfoszfát-izomeráz 149-159 és 206-218 szakaszainak.

A mioglobin az oxigén szállításában, a triózfoszfát-izomeráz pedig a glikolízisben játszik fontos szerepet, így ezek változása befolyásolhatja mind az aerob, mind az anaerob energiatermelést. Ismert, hogy emelkedett ROS aktivitás lecsökkenti a hipoxia-indukált faktor-1 α expresszióját, ami viszont kontrollálja a glikolitikus enzimek működését [320]. Ezen túlmenően a mioglobin [321] és a Hsp72 [322] szintjei növekednek hipoxiában, amely viszont alacsony ROS aktivitással párosul.

Eredményeinkből arra lehet következtetni, hogy még a mitokondriális genom károsítása előtt a ddC számos ponton befolyásolja a sejtek metabolizmusát és jelátvitelét. Ezzel az mtDNS károsítástól független mechanizmust találtunk, amelyben a ddC-indukálta sejtkárosodás hozzájárul a kardiomiopátia kifejlődéséhez.

4.7. AMILOID 1-42 PEPTIDDEL (A β 1-42) KAPCSOLATOS VIZSGÁLATOK

4.7.1. A β 1-42-höz kötődő fehérjék meghatározása [LIII-LIV]

Az Alzheimer-kór a központi idegrendszer progresszív mentális hanyatlással és az idegsejtek pusztulásával járó neurodegeneratív betegsége, amelyet β -amiloid peptidek kóros túltermelése jellemez, amelyek az agyban mind intra-, mind extracellulárisan aggregálnak és neuritikus plakkokat képeznek [323]. A 39-43 aminosavat tartalmazó β -amiloid peptidek a transzmembrális amiloid prekursor fehérjéből (APP) többszörös enzimátikus hasítással képződnek [324] és a központi idegrendszerben különböző aggregáltsági formában (monomer, oligomerek, protofibrillumok és fibrillumok) vannak jelen [325]. Sajátos szerkezetük és fiziko-kémiai tulajdonságaik révén a β -amiloid peptidek hozzá tudnak kapcsolódni más biomolekulákhoz, így peptidekhez, fehérjékhez, lipidekhez, proteoglikánokhoz stb. [326], s ez a kötődés hatással lehet különböző biológiai folyamatokra. Többszörösen bizonyított, hogy a ezek a peptidek mind *in vitro*, mind *in vivo* szinaptotoxikusak és/vagy neurotoxikusak lehetnek, amely hatás lehet közvetlen, ill. gyulladás által közvetített [327, 328]. Azonban a különböző nagyságú és aggregáltsági fokú β -amiloid peptidek neurotoxikus hatásának molekuláris mechanizmusa csak részben ismert. Az A β átalakulása oligomerekből fibrilláris formába együtt jár a membrán lipidekhez és fehérjékhez való kötődésének megnövekedésével [329]. Az Alzheimer-kór kezdetének első jele az idegsejtek szinapszisainak károsodása, messze megelőzve a betegség klinikai tüneteit. A szinapszisok neurotoxikus károsodása, pusztulása együtt jár a szinaptogenezis és a neuronális transzmisszió visszaszorulásával, a szinaptikus fehérjék termelésének és működésének zavarával [330]. A mitokondriumok működési zavarai szintén szerepet játszhatnak ideggyógyászati ill. neurodegeneratív betegségekben [331].

A β -amiloid peptidek szinaptikus plazmamembrán-fehérjékhez történő kötődésének megakadályozása logikus megoldásnak tűnt az Alzheimer-kór megelőzésére, ill. lelassítására. Ehhez szükség volt a β -amiloid peptidekkel kölcsönható, kötődő fehérjék felderítésére. Ilyen kölcsönhatások kimutatására egy-egy fehérje esetében történtek vizsgálatok [332, 333], azonban a β -amiloid peptidekhez kötődő fehérjék átfogó feltérképezése nem történt meg, ezért kutatócsoportommal célul tűztük ki ezen fehérjék meghatározását.

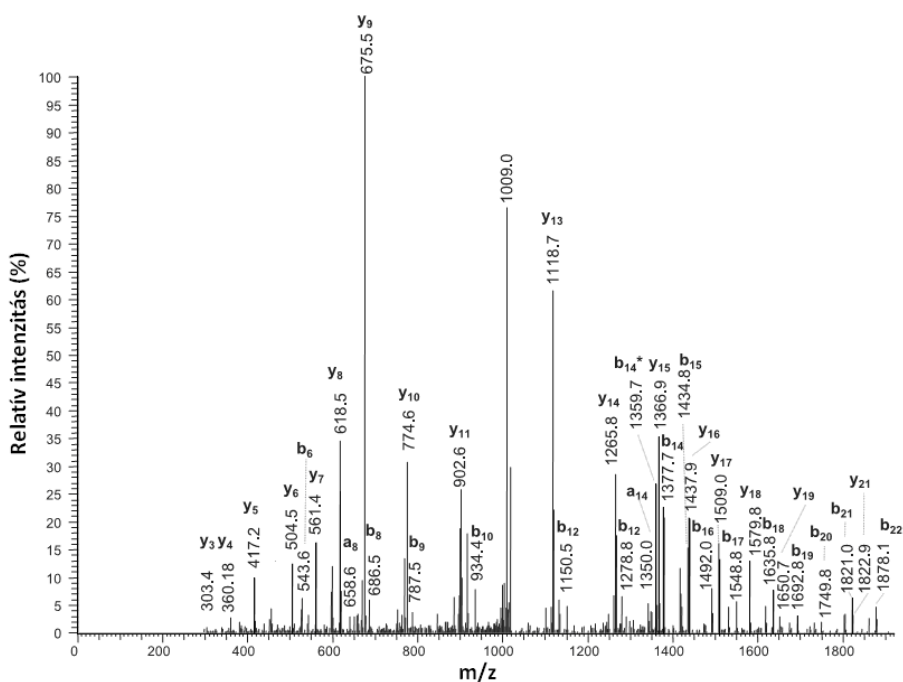
Kísérletek

Fibrilláris A β 1-42-t az SzTE Orvosi Vegytani Intézetében szintetizált „monomer” A β 1-42-ből készítettünk. Szubcelluláris szinaptoszóma membránfrakció patkányagyból,

cukorgradiensben végzett ultracentrifugálással készült. Ennek 1%-os Triton X-100-ban oldódó frakcióját fibrilláris A β 1-42-vel, ill. kontrollként a hasonló β -redőzött réteg szerkezettel rendelkező krisztallinnal inkubáltuk (48 h, 37 °C). A nem kötődő fehérjéket kétszeri mosással eltávolítottuk, majd a csapadékban lévő fehérjéket „shotgun” proteomikai módszerrel (fehérjekeverék tripszines hidrolízisét követő LC-MS/MS analízis (75 μ m x 100 mm BioBasic C18 oszlop, Thermo Electron LTQ lineáris ioncsapdás tömegspektrométer). A tömegspektrometriás adatok feldolgozása MASCOT adatbázis-kereső programmal, az aktuális SwissProt rágcsáló-fehérjeadatbázis felhasználásával történt.

Eredmények és megbeszélésük

Szinaptikus plazmamembrán preparátumból fibrilláris A β 1-42-vel és krisztallinnal koprecipitáltuk a hozzájuk kapcsolódott fehérjéket, amelyeket először „shotgun” módszerrel (LC-MS/MS) analizáltunk. Az LCQ lineáris ioncsapdás tömegspektrométer kiváló készülék peptidek MS/MS mérésére, általában szép **b**- és **y**-ionsorozatot kaptunk (68. ábra). Az ábrán a patkány szinapszin-1 fehérje 86 QTTAAAAATFSEQVGGGSGGAGR 108 peptidjének MS/MS spektruma látható.



68. ábra

A nanoLC-n 28,57 perc retenciós idővel eluálódó peptid (m/z 2051,97) MS/MS spektruma (b- és y-ionok)
 nanoLC: 75 μ m x 100 mm BioBasic C18 oszlop, A eluens 0,1% hangyasav vízben, B eluens: 0,1% hangyasav
 acetonitrilben, gradiens: 0-60% B/60 perc, áramlási seb: 200 nl/perc
 MS/MS: kapilláris feszültség: 2 kV, CID energia 35%, adat-függő üzemmód

Fibrilláris A β 1-42-vel koprecipitált fehérjék közül 53-at azonosítottunk kettőnél több peptid MS/MS szekvenciájával és >44 találati pontszámmal. Közülük 13 szintén megtalálható volt azok között a fehérjék között, melyek a kontrollként használt krisztallinhoz aspecifikusan kötődtek. A 40 együtt koprecipitált fehérje azonosításának adatai a Függelék 8. Táblázatában láthatók. A fehérjéket az Alzheimer-kórban potenciális biológiai jelentőségük alapján hat csoportba osztottuk: 1., Alzheimer-kórral kapcsolatosan vizsgált fehérjék, 2., citoskeletonális szerveződéssel kapcsolatos fehérjék, 3., neuronális sejtadhéziós fehérjék, 4., egyéb neuronális membránfehérjék, 5., neuron-specifikus fehérjék, 6., mitokondriális fehérjék.

Eredményeink szerint a fibrilláris A β 1-42 kölcsönhatásba lép a szinaptikus membrán és mitokondriális fehérjékkel, ami arra utal, hogy az amiloid számos biológiai rendszerrel kapcsolatba kerül és károsíthatja azokat [334]. Azonban az így kapott fehérjelista nem ér semmit, ha nem tudjuk megfelelően értelmezni a fenti kölcsönhatásokat. Ehhez széleskörű biológiai ismeretekre van szükség, hogy esetünkben a 40 fehérjéről összegyűjtött irodalmi információt értelmesen integrálni lehessen, hogy ezáltal új kutatások kiindulópontjául szolgálhassanak. Kiemelem a koprecipitátumban jelenlévő 6 legnagyobb mennyiségű fehérjét. A szinapszinok kulcsszerepet játszanak az idegsejtek neurotranszmitter felszabadulásában és a szinaptikus csatlakozások fenntartásában [335]. Az Alzheimer-kór késői fázisában a hippocampusban regionális szinapszin-I eltűnést tapasztaltak [336]. A mi munkánk volt az első, amelyik direkt kölcsönhatást talált a szinapszinok és a β -amiloid peptidek között. A 2',3'-ciklikus nukleotid 3'-foszfodiészteráz kötődése azt jelzi, hogy a β -amiloid peptidek hozzájárulhatnak a kór kialakulásához, megzavarva a mielin képződését [337]. Fibrilláris β -amiloid 1-42-ről kimutatták, hogy a mielin hüvelyhez tapad [338]. A „vakuólum ATP szintáz alegység B agyi izoforma” a V-ATP-áz enzimkomplex része és mint ilyen, az idegsejtekben részt vesz a neurotranszmitterek tárolási folyamatában [339], ill. elősegíti az enzim kikötését az aktin-alapú citoskeletonhoz [340]. Az enzim ezen két nagyon fontos funkciójának zavara megfelel az Alzheimer-kórban leírt patológiai folyamatoknak. Tubulinok, mint a mikrotubulusok alegységei nagy mennyiségben találhatók az agyban. Kötődésük az amiloid különböző formáihoz már ismert [341]. Kísérleteink egyik legfontosabb eredménye a β -amiloid és a GAPDH kölcsönhatásának kimutatása. A GAPDH a glikolízisben betöltött kulcsszerepe mellett nem-glikolitikus folyamatokban (membránfúzió és endocitózis, citoplazmikus mRNS reguláció, magi tRNS export, DNS replikáció stb.) is szerepet játszik [342], valamint különböző neurodegeneratív betegségekkel is kapcsolatba hozták [343]. Ezért külön vizsgálatsorozatot végeztünk β -amiloid peptidek és a GAPDH kölcsönhatásának szélesebb körű megismerésére. Először arannyal jelzett GAPDH-ellenes antitestekkel

kimutattuk, hogy a GAPDH kötődik az A β 1-42 fibrillumok felszínén. Megállapítottuk, hogy a kötés nem ionos természetű, mert nem függött az inkubációs médium sókoncentrációjától. A GAPDH nemcsak a fibrilláris A β 1-42 -vel, de még a nem-fibrilláris állapotú peptiddel is koprecipitálódik, de nem kötődik β -amiloid 1-40-hez. Különböző szubcelluláris frakcióból izolált (pl. mitokondrium) GAPDH-k mindegyike kölcsönhatásba lép a fibrilláris A β 1-42-vel. Ez a direkt kölcsönhatás megítélésünk szerint fontos szerepet tölthet be az Alzheimer-kór molekuláris folyamataiban.

Korábban említettem, hogy a szinaptikus plazmamebrán-fehérjék és az A β 1-42 közötti kölcsönhatás megakadályozása fontos beavatkozási pont lehet az Alzheimer-kór terápiájában. Kötődési vizsgálataink során azonosított 40 fehérjében szukcesszív approximációs algoritmussal működő számítógépes programmal feltérképeztük a mindegyik fehérjében előforduló hasonló pentapeptideket és a hasonlóság alapján megállapítottuk, hogy az 1-5 pozíciókban milyen az egyes aminosavak előfordulási gyakorisága. Ezek alapján hat pentapeptidet szintetizáltunk, amelyek közül több kivédte az A β 1-42 citotoxikus hatását. Azóta már több, mint 50 analógot szintetizáltunk, és közülük számos mind *in vitro*, mind *in vivo* tesztekben hatásosnak mutatkozott az A β 1-42-vel szemben. Szabadalmi okok miatt erről a nagyon szép munkáról nem tudok beszámolni.

4.7.2. Oligomer A β 1-42 toxikus hatásainak proteomikai vizsgálata [LV]

Ma már általánosan elfogadott, hogy a A β 1-42 központi szerepet játszik az olyan, neurodegeneratív megbetegedéshez vezető működési zavarokkal járó folyamatokban, mint a membránok felbomlása, mitokondriumok hibás működése, oxidatív stressz, endoplazmás retikulum stressz, leromlott szinaptikus jelátvitel és axonális szállítás [344]. Jelenleg az A β 1-42 oligomer formáit tekintik a β -amiloid peptidek igazán toxikus formájának [345]. Az egyre szaporodó ismeretek ellenére még ma sem ismert az amiloid peptidek által indukált folyamatok összessége, ráadásul az A β 1-42 különböző formái másképpen hatnak az egyes biokémiai folyamatokra [346]. Az A β 1-42 oligomerizációs, aggregációs folyamatait nehéz kontrollálni, ezért nem mindig lehet tudni, hogy milyen állapotú preparátummal dolgoztak. Kutatócsoportommal célunk volt egy kontrollált aggregáltsági fokú A β 1-42-vel meghatározni, hogy a peptid milyen globális fehérjeszint-változásokat okoz az Alzheimer-kór kutatásában elfogadott SH-SY5Y humán neuroblasztoma sejtvonalon.

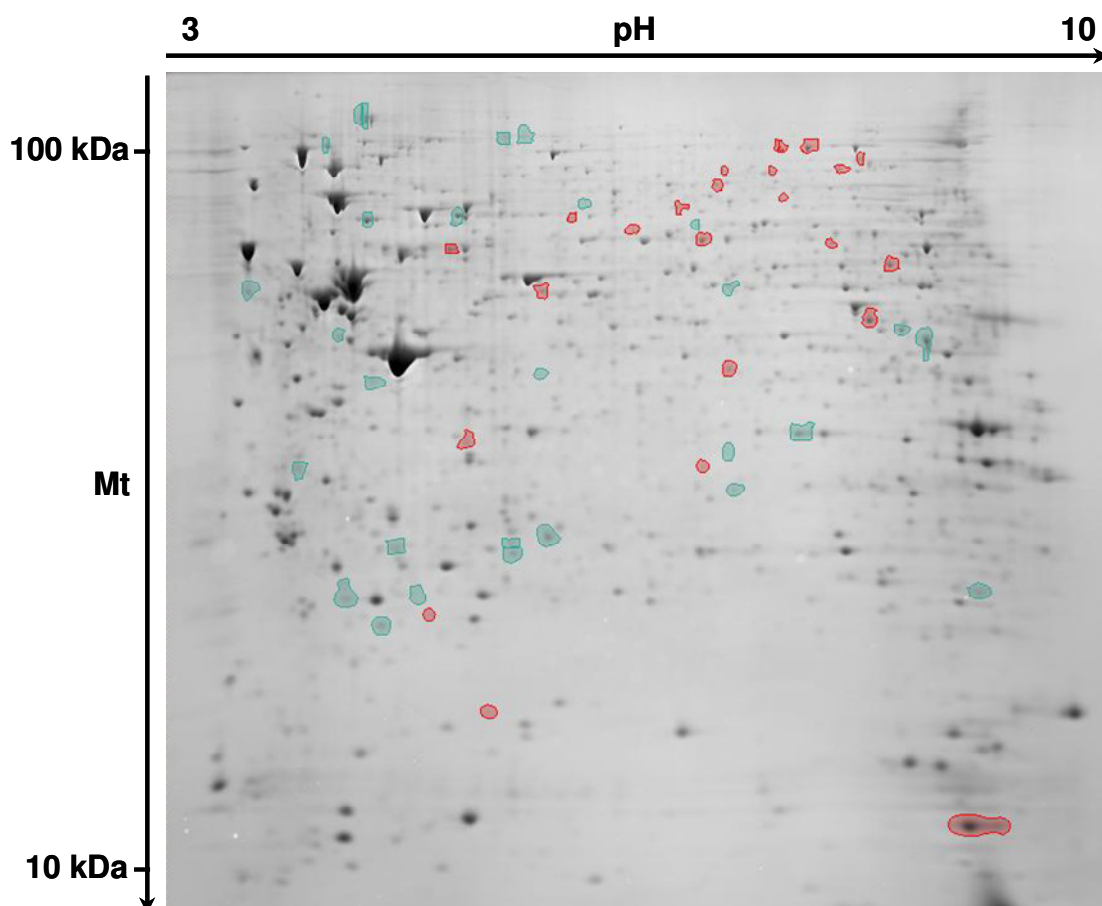
Kísérletek

Az SzTE Orvosi Vegytani Intézetében szintetizálták az A β 1-42 olyan nem aggregáló prekursorát (izo-A β 1-42), amelyik a Gly²⁵ és a Ser²⁶ között nem amid-, hanem észterkötést tartalmaz [347]. Ez a peptid mindaddig nem aggregál, amíg nem kerül fiziológiás pH-jú oldatba. Ekkor egy O $\rightarrow$ N acilvándorlással *in situ* kialakul a szabályos, csak savamid kötéseket tartalmazó A β 1-42 peptid, melynek aggregációs történéseit követni lehet. SH-SY5Y humán neuroblasztoma sejteket kezeltünk 8 órán keresztül frissen feloldott, kis oligomereket tartalmazó izo-A β 1-42-vel. A sejtek lizálása után a kapott fehérjéket 2D elektroforézissel analizáltuk. Az FLA-5100 típusú lézer-szkenneren beolvasott kezelt és kezeletlen minták gélképeit Progenesis SameSpots szoftverrel hasonlítottuk össze. Azokat a fehérjefoltokat, amelyek intenzitásváltozása nagyobb volt 50%-nál, tripszines emésztés követően nanoUPLC-Q-TOF MS rendszerrel (Waters Corp.) LC-MS/MS módszerrel analizáltuk, s a fehérjéket „ProteinLynx Global Server” szoftver és az aktuális UniProt adatbázis segítségével azonosítottuk.

Eredmények és megbeszélésük

A 2D elektroforézis reprodukálhatósága megfelelt a módszertől elvártaknak (median CV%= 11,8% a kezeletlen mintákra, 15,7% a kezeltéknél). Géleken egyenként kb. ezer foltot detektáltunk, de közülük csak 649 folt pozíciója egyezett meg az összes gélen (9 kezeletlen + 9 kezelt tenyészet, 3-3 egybetéve). Ezek közül 52 foltnak az intenzitása változott meg szignifikánsan (69. ábra). A proteomikai fehérjeazonosítás után 47 fehérjét detektáltunk (Függelék 9. táblázat, amelyek közül 22 mennyisége növekedett, 25-é csökkent A β 1-42-vel történt kezelés hatására. A változás mértéke 3,6-szoros csökkenéstől 3,5-szörös növekedésig terjedt.

A csökkenő, ill. növekvő fehérjéket funkcióik alapján jól definiált csoportokba lehetett sorolni. A down-regulált fehérjék a fehérje bioszintézisben (transzláció), metabolikus folyamatokban, citoskeletális organizációban, transzkripció szabályozásában, mRNS processzálasában, fehérjefeldolgozásban (transzport, proteolízis, poszt-transzlációs módosítás), míg az up-regulált fehérjék legnagyobb része a stresszválasszal kapcsolatos, de találtunk fehérje feldolgozással, metabolikus folyamatokkal és a transzkripcióval összefüggésbe hozható fehérjéket is. Az azonosított fehérjékből látható, hogy az A β 1-42 toxicitása számos intracelluláris életfolyamatot érintett. A stresszfehérjék nagy száma jelzi a sejtek beindult védekezési mechanizmusát az A β 1-42-vel szemben. Többségük az endoplazmás retikulum chaperon fehérjéje.



69. ábra

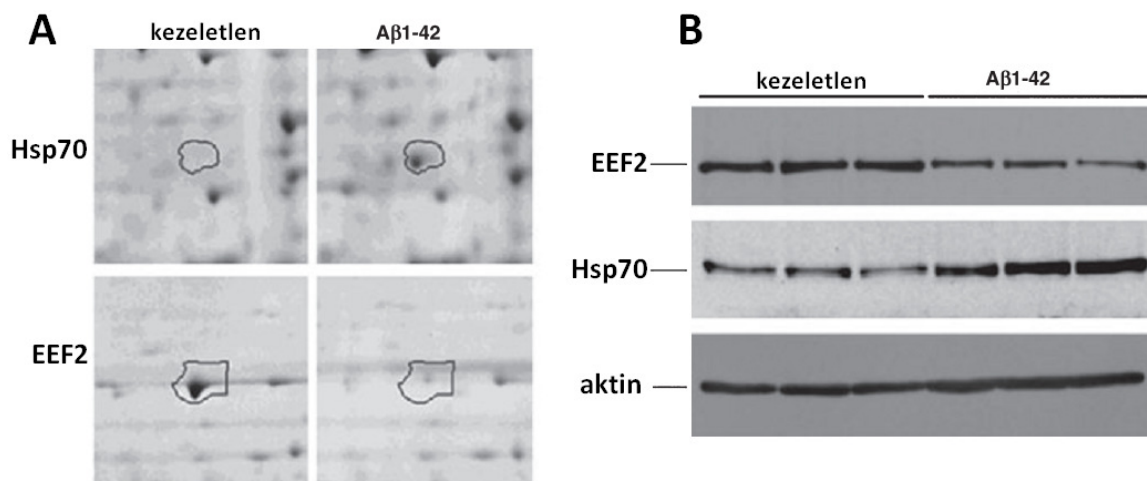
Az SH-SY5Y sejtvonal reprezentatív 2D-PAGE képe

A pirossal jelzett a megnövekedett, míg a zölddel jelzettek a csökkent intenzitású foltokat mutatják
IEF: 24 cm pH 3-10 IPG csík, SDS-PAGE: 24 x 20 cm gradiens gél (10-14,5%), festés: RuBPs

A klasszikus proteomikai 2D PAGE-MS fehérjeazonosítás eredményeinek validálásához a két legnagyobb változást mutató fehérje, az „elongációs faktor 2” (-3,6x) és a Hsp70 (+ 3,5x) mennyiségének változását specifikus antitestek segítségével Western-blot módszerrel visszaigazoltuk (70. ábra).

Számos proteomikai tanulmány jelent meg Alzheimer-kórral kapcsolatosan: vizsgálták a betegséggel kapcsolatos fehérjéket kolinerg SN56 sejteken [348], cerebrospinális folyadékban [349], transzgén Alzheimer-kóros egerekben [350, 351] stb., de a neurodegeneráció teljes mechanizmusa továbbra is tisztázatlan. A 2D elektroforézisen alapuló proteomikai vizsgálatok előnye, hogy egyszerre lehet sok fehérje expressziós vagy poszttranszlációs állapotváltozásait áttekinteni. Kísérletünkben sok fehérje mennyiségének változását figyeltük meg, amelyeket egyenként külön-külön kapcsolatba hoztak az Alzheimer-kórral, de itt egyszerre lehet látni a mitokondrium citromsavciklusának és energiatermelő folyamataiban résztvevő fehérjék, a riboszómális fehérjebioszintézis, a citoskeletális szerveződés és a

metabolikus folyamatok fehérjéinek csökkenését és a stresszválasz beindulását jelző fehérjék intenzív növekedését. A kísérlet alapján érintett folyamatok további vizsgálata segíthet jobban megérteni az amiloid peptid által kiváltott sejthalál mechanizmusát.



70. ábra

A Hsp70 és EEF2 fehérjék expressziós profilja 2D elektroferogramon (A) és Western-blot képen (B)

4.7.3. Oligomer Aβ1-42-vel kölcsönható fehérjék azonosítása fehérjечip-en [LVI]

A fehérjечip (protein-array) technológia új lehetőséget kínál fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatására, kinázok szubsztrátjainak azonosítására, kis molekulák célfehérjéinek térképezésére, immunválasz biomarkerek, keringő antitestek felismerésére, fehérjeexpresszió meghatározására antigén-antitest kötési reakció alapján stb. [352]. A fehérjечip technológia a génchip technológia alapján jött létre és kifejlődését a fehérjekémia, a miniaturizálás, a robot-technika és az informatika fejlődése tette lehetővé. Segítségével egyszerre több száz, több ezer kölcsönhatás tanulmányozható egy tárgylemezen.

Az Invitrogen Inc. (USA) Protoarray 4.0 proteinchipje egy 8163 különböző rekombináns humán fehérjét tartalmaz két-két példányban külön-külön, miniatűr foltokban nitrocellulózzal bevont üveglemez felületéhez kötve. A fehérjéket baclovírus expressziós rendszerrel rovarsejtekben, optimalizált eljárással állították elő [353]. A rovarsejtek fehérje-folding és poszt-transzlációs rendszere hasonló az emlős sejtekéhez [354] (szemben az *E. coli* sejteivel), így joggal feltételezhető, hogy az elkészült fehérje poszt-transzlációsan módosított, biológiailag aktív formában készül el.

Az előző két vizsgálati módszerrel szemben, ahol a fibrilláris Aβ1-42 kötődését egy korlátozott fehérjekészletű (szinaptoszóma-membránpreparátum) rendszerben, ill. az oligomer

A β 1-42 hatását élő sejteken vizsgáltuk, laboratóriumomban most fehérjechipen egyszerre több, mint 8000 humán fehérje és az oligomer A β 1-42 kölcsönhatását kívántuk tanulmányozni.

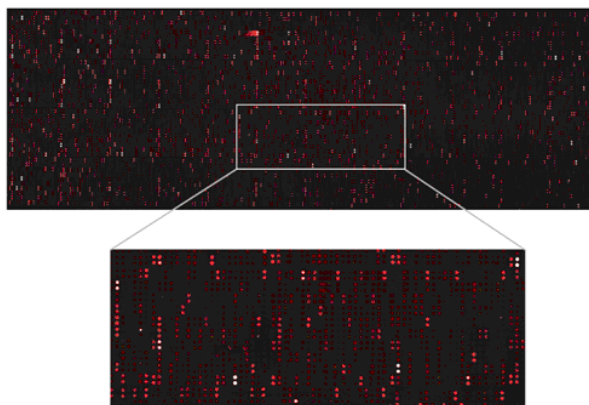
Kísérletek

Invitrogen Inc. Protoarray 4.0 proteinchip felszínére 10 μ M koncentrációjú, izo-A β 1-42-ből készült oligomer amiloid oldatot tettünk. Másfél órás inkubáció után a nem kötődött β -amiloidot lemostuk és az egyes fehérjéken megkötődött A β 1-42 mennyiségét Alexa-647 fluoreszcens festékkel jelzett monoklonális antitestekkel történt reakció után GenePix Personal 4100A mikroarray-szkennerrel határoztuk meg. Az eredményeket a háttér levonása után komplex, robusztus algoritmussal értékeltük ki [355].

Eredmények és megbeszélésük

A Protoarray fehérjechipen végrehajtott kísérlet során a chip felszínére kötött 8163 fehérje közül a foltok fluoreszcencia-intenzitásának mérése alapján 324 specifikus kölcsönhatását mutattuk ki oligomer A β 1-42-vel (71. ábra).

Az A β 1-42-vel kölcsönható fehérjék funkcionális osztályozása Gene Ontology (GO) analízissel, az internet-alapú DAVID tudásbázis (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) felhasználásával történt, ami a 324 fehérjét 30 funkcionális kategóriába sorolta (14. Táblázat). Ezek közül a legérintettebb GO biológiai funkció kategória a fehérje-bioszintézis: a transzláció ($p = 7,12 \times 10^{-7}$), amelybe 24 fehérje (72/A. ábra) és a transzlációs elongáció ($p = 4,57 \times 10^{-7}$), amelybe 13 fehérje tartozott. Ezen fehérjék jelentős része mitokondriális és nem-



71. ábra

Protoarray fehérjechip fehérjeinek és az oligomer A β 1-42 kölcsönhatásának kimutatása fluoreszcens monoklonális anti-A β 1-42 antitesttel

14. Táblázat

Az A β 1-42-vel kölcsönható humán fehérjék GO funkcióanalízise

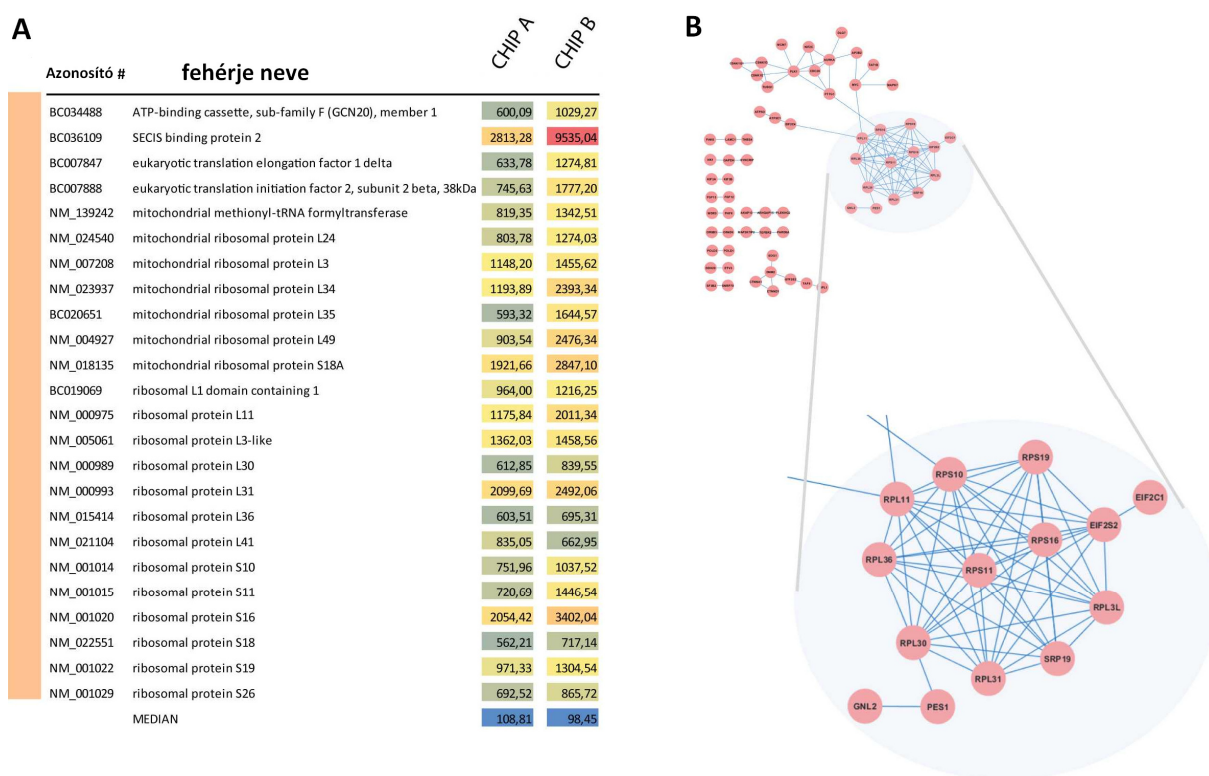
GO kifejezés	Fehérje #	p érték	Benjamini*
transzláció elongáció	13	4,57E-07	2,76E-04
transzláció	24	7,12E-07	2,15E-04
RNS metabolikus folyamat	39	1,22E-05	2,45E-03
RNS feldolgozás	26	2,25E-04	3,35E-02
transzkripció szabályozás	55	4,12E-04	4,85E-02
nukleobázis, nukleozid, nukleotid és nuklein sav metabolikus folyamat	59	4,32E-04	4,25E-02
génexpresszió szabályozás	61	4,96E-04	4,19E-02
makromolekula bioszintézis folyamat szabályozás	58	1,34E-03	9,66E-02
mitózis	12	2,68E-03	1,65E-01
M fázis vagy mitotikus sejtciklus	12	3,20E-03	1,76E-01
nukleoszóma szerveződés	7	3,21E-03	1,62E-01
sejt bioszintézis folyamat szabályozás	58	3,48E-03	1,61E-01
RNS metabolikus folyamat szabályozás	37	4,50E-03	1,89E-01
M fázis	14	4,93E-03	1,92E-01
immunoreceptor diverzifikáció	4	6,91E-03	2,44E-01
mRNS metabolikus folyamat	16	7,43E-03	2,45E-01
nukleoszóma összeszerelés	6	8,77E-03	2,69E-01
kromatin összeszerelés és szétszerelés	7	9,96E-03	2,85E-01
DNS-függő transzkripció szabályozás	34	1,29E-02	3,38E-01
fehérje-DNS komplex összeszerelés	6	1,35E-02	3,37E-01
ncRNS processzálas	9	4,70E-02	7,50E-01
immunoglobulin diverzifikáció	3	5,08E-02	7,61E-01
mRNS processzálas	12	6,25E-02	8,16E-01
immunoglobulin termelés	3	6,34E-02	8,07E-01
axon transzport	3	6,34E-02	8,07E-01
osztódási orsó szerveződés	4	6,43E-02	7,99E-01
DNS metabolikus folyamat	16	7,04E-02	8,17E-01
transzkripció inicializálás	5	7,90E-02	8,41E-01
ncRNS metabolikus folyamat	9	9,54E-02	8,85E-01
RNS katabolikus folyamat	4	9,98E-02	8,88E-01

*Benjamini-Hochberg teszt [356]

mitokondriális riboszóma-komponens, ill. transzlációt inicializáló faktor. Ezeken túl, sok fehérje tartozik az RNS processzálas, axonális transzport és sejtciklussal kapcsolatos kategóriákba, támogatva az A β 1-42 intracelluláris hatásának hipotézisét [357].

A GO alapú funkcionális csoportosításon túl elvégeztük a STRING analízist is [358], amely különböző adatbázisok (Pubmed, MINT, KEGG, BIND, BioGRID) szűrésével készíti el a kölcsönható fehérjék hálózatát. A 72. ábra B részén látható, hogy a A β -t kötő fehérjék szorosan kapcsolódnak egymáshoz.

ELISA kísérletben igazoltuk, hogy A β 1-42 koncentrációfüggően kötődik patkány hippocampusból tisztított riboszóma komplexekhez, valamint, hogy az A β 1-42 gátolta a riboszomális fehérjeszintézist (nyúl retikulocita transzlációs reakcióban (Promega, WI) csökkent a fluoreszcens luciferáz enzim bioszintézise).



72. ábra

A GO transláció kategória detektált tagjai (A), az A β -t kötő fehérjék interakciós analízise (STRING) (B)
Nagyítás: riboszómális fehérjék közötti kapcsolatok.

Eredményeink szerint az A β 1-42 leginkább a fehérje-bioszintézisben résztvevő fehérjékhez kötődik, azokkal lép kölcsönhatásba. Hasonló eredményeket kaptunk az SH-SY5Y sejteken végzett kísérletekkel is. Fontosságuk ellenére a riboszómális fehérjék amiloid toxicitásában játszott pontos szerepe még nem ismert, valószínűleg a mRNS megfelelő kezeléséért felelősek [359]. A Robledo és mtsai által kimutatott riboszómafehérjék közül többet úgy azonosítottunk, hogy kötik az A β 1-42-t. Az Alzheimer-kór patogenezisében az egyik érintett sejtcompartment a mitokondrium, ahol az A β toxikus szerepe ismert [360]. A mitokondrium károsításáért az A β mitokondriális fehérjékhez való kötődését teszik felelőssé [361]. Valószínű, hogy az általunk talált 13 mitokondriális és 6 riboszómális fehérjén okozott együttes hatása az, ami a fehérjeszintézist gátolja.

4.7.4. Ösztadiol hatása az A β -indukálta kolinerg sejtpusztulásra [LVII]

Amint azt korábban említettem, az Alzheimer-kór velejárója az A β -peptidek felhalmozódása az agyban és a kognitív funkciók működési zavarai, amelyek a bazális előagyi kolinerg rendszer korai károsodásának következményei [362]. A kór előfordulása a nemek között eltérő és kapcsolatba hozható az ösztrogének mennyiségének (elsősorban az ösztadiol-

17 β , E2) az idő előrehaladtával történő csökkenésével [363]. Az E2-alapú hormonpótló terápia néhány klinikai kipróbálásnál csökkentette az Alzheimer-kór kockázatát és a kognitív működési zavarokat, amely felveti az E2 védő szerepét [364, 365]. Az E2 neuroprotektívnek bizonyult az Alzheimer-kór *in vitro* és *in vivo* kísérleti modelljeiben is [366]. A hormonpótló terápia hasznosságáról azonban megoszlanak a vélemények, mert nem mindig lehetett meggyőződni a szellemi frissességre gyakorolt szignifikáns hatásáról [367, 368]. Mind az A β , mind az E2 jelentős változásokat indukál az agy különböző területein pl. a génexpresszió szabályozásával [348,369]. Itt most nem részletezett közleményünkben kimutattuk [LVIII], hogy az E2 szabályozza a szinaptikus fehérjéket és folyamatokat, megnöveli a citoszkeleton flexibilitását és megváltoztatja az agy szénhidrát-metabolizmusát. Eredményeink arra utalnak, hogy az E2 kicsiny, de lényeges változást indukál különböző fehérjehálózatokban és mintegy kumulatív hatásként az agy működését alapállapotból egy flexibilisebb, gyorsabb reagálóképességű állapotba állítja.

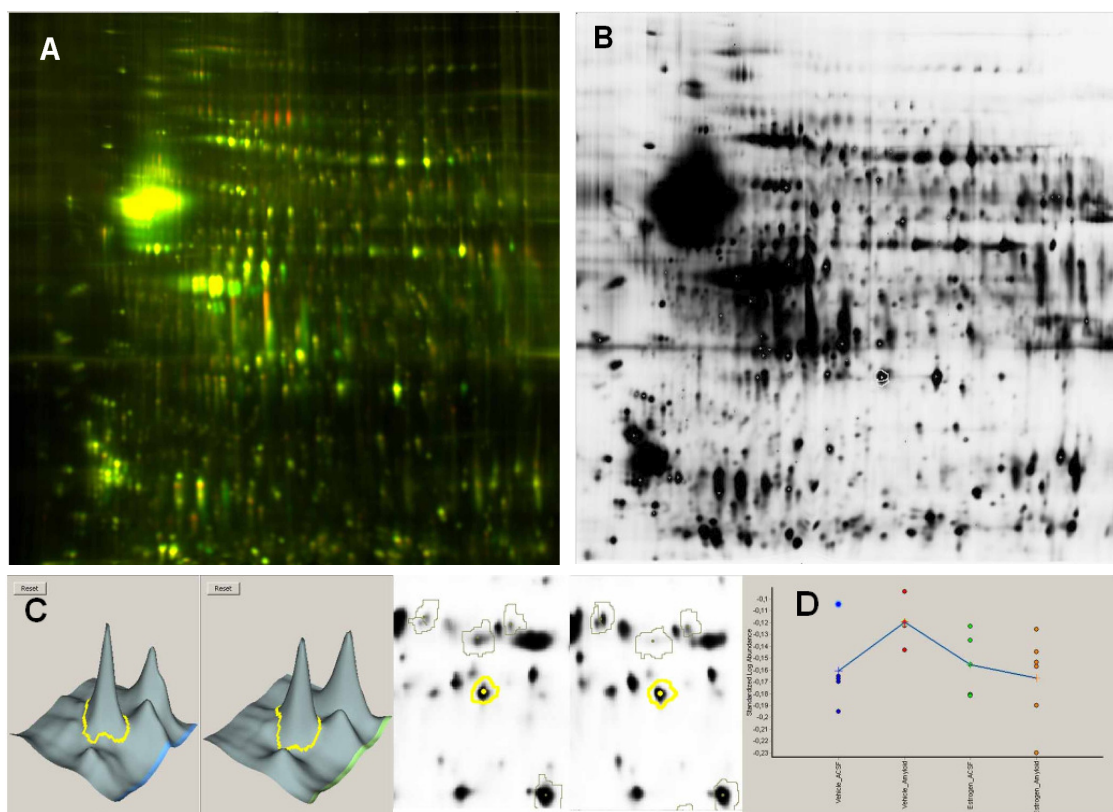
Az agyi proteom összetételének nyomonkövetésével fehérjeszintű választ kerestünk az A β 1-42 *in vivo* neurotoxicitására, ill. az ösztrogén előkezelés hatására.

Kísérletek

Ovariektómizált (kétoldali petefészekírtott) 60-74 napos nőtény C57BL6 egereknek egyik csoportjának etil-oleátban 1 μ g E2-t, a másiknak csak etil-oleátot (E0) adtunk *subcután*. 24 órával később mindkét csoport egyik fele 2 x 1 μ l 600 μ M előre elkészített (24 óra aggregálás mesterséges cerebrospinális folyadékban (ACSF)) A β 1-42-t, másik fele csak ACSF-t kapott a agy megfelelő részébe (nucleus basalis magnocellularis-substantia innominata, NBM-SI). Egy nap múlva az állatok agyát kivették és az ún. „punch” technikával [370] kimetszették az NBM-SI és a SSCTX (szomatoszenzoros kéreg, V. réteg) agyterületeket. A rendkívül kis szövetmennyiség miatt 6 ugyanolyan módon kezelt egér azonos szöveteit egyben (pool) vizsgáltuk tovább. A mintákat homogenizálás után fluoreszcens 2D-differenciál-gélelektroforetikus (2D-DIGE) rendszerben futtatva (3 x 5 μ g) meghatároztuk, hogy a különböző csoportokban melyik fehérjefoltnak változott meg az intenzitása. A foltokban lévő fehérjéket tripszines hidrolízist követően LC-MS/MS módszerrel azonosítottuk: a peptideket ProtID-Chip-43 LC-chipen (75 μ m x 43 mm, ZORBAX 300 C18 5 μ m + csapdaoszlop, Agilent, USA) szétválasztva Agilent XCT Plus ioncsapdás tömegspektrométerrel MS/MS üzemmódban analizáltuk, majd a fehérjéket az Agilent SpectrumMill szoftverrel, az aktuális nrNCBI adatbázisból azonosítottuk.

Eredmények és megbeszélésük

A kísérletben az A β 1-42 és az A β 1-42 + E2 hatására bekövetkező korai fehérjeváltozásokat kívántuk meghatározni. Az NBM-SI 2D-DIGE képén 1723 foltot detektáltunk (73. ábra), melyből szigorú szűrés után 56 fehérjének, míg az SSCTX minták 1440 foltjából 35 fehérjének a változását tudtuk meghatározni (Függelék 10. táblázat).



73. ábra

A: reprezentatív 2D-DIGE az NBM-SI-ből, B: 2D-PAGE az NBM-SI-ből fehérjeazonosításhoz, C: a 2D-DIGE egyik foltjának rekonstruált 3D képe, D: a folt koncentrációjának változása a csoportok között

Először az E0-A β 1-42 csoportot hasonlítottuk az E0-ACSF csoporthoz, mert ez mutatta az neurotoxicitását, míg az E2- csoportot az E0-hoz, mert ebből lehetett következtetni az E2 esetleges neurotoxicitást kivédő szerepéről. A változó fehérjéket funkciójuk alapján itt is különböző csoportokba soroltuk: antioxidáns védelem, citoskeletális szerveződés, metabolizmus, fehérjeforgalom és stabilitás, jelátvitel, szinaptikus működés, egyéb. A Függelék 11. táblázatának adataiból igen sok következtetést le lehet vonni az E2 és az A β 1-42 hatására az NBM-SI-ben bekövetkezett változásokból, de szempontunkból érdekes az, hogy az A β 1-42 ismét számos biokémiai folyamatot érintett, de káros hatásai E2 előkezelésre csökkentek, nem alakultak ki, ill. ellenkező irányú folyamatok indultak be. Pl. a

dihidropirimidináz-2 fehérje expressziója A β 1-42 kezelés hatására 44%-kal megemelkedett, míg az E2 előkezelés 27%-kal csökkentette azt. Hasonló jellegű változások történtek az SSCTX agyterületen is. (Kollégáim immunhisztokémiai eredményeiből is az látszik, hogy E2 védő szerepet tölt be a A β 1-42 kolinotoxikus hatásával szemben: a kolinerg sejtek pusztulása 23%-ról 15 %-ra csökkent.)

Ha egyenként végignézzük az egyes megváltozott expressziójú fehérjéket, majd mindegyikről alapos irodalmazással kiderítjük, hogy mikor és milyen változások következnek be, elég nagy biológiai rálátással fel lehet állítani egy hipotetikus mechanizmust mind a neurotoxicitás, mind az E2 által kifejtett védőhatás folyamatára. Kollégáim ezt megtették, felrajzolták a különböző útvonalakat, ahol az azonosított fehérjéknek szerepük lehet.

A proteomikai vizsgálatainkból ismételten kiderült, hogy a proteomika alkalmas a biológiai rendszer fehérjéinek egy adott időpillanatban történő globális bemutatására. Ha „megzavarjuk” ezt a rendszert, ismét előáll egy új állapot. A két állapot közötti különbségek jellemzőek az adott hatásra, a levonható következtetések azonban még csak hipotézisek, amelyeket új kísérletekkel kell igazolni.

5. TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Módszert dolgoztunk ki caerulein peptid „nagy” tételben történő szintézisére, melynek követéséhez, preparatív tisztításához és minőségellenőrzéséhez folyadék-kromatográfiás és kapilláris elektroforetikus eljárásokat fejlesztettem ki.
2. Kidolgoztuk a több diszulfidhidat tartalmazó peptidek (skorpióméreg charybdotoxin és iberiotoxin) optimális gyűrűzárási reakciójához (híg, a peptid 0,05 M oldata) legjobban illő preparatív HPLC tisztítás körülményeit. A peptidek tisztaságát két ortogonális módszerrel ellenőriztem.
3. Megoldottuk a humán, csirke, patkány és sertés galaninok és fragmenseik szilárdfázisú szintézise utáni HPLC tisztítását. A peptidek tisztaságellenőrzése során megállapítottam, hogy a kapilláris elektroforézis kiegészítő módszere az RP-HPLC-nek. A kapilláris elektrokinetikus kromatográfia könnyen használható, gazdaságosabb és kevesebb hulladékoldószert termelő alternatívája lehet HPLC-nek.
Megállapítottam, hogy a galanin peptidek RP-HPLC-s retenció 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.
4. Nagyhatékonyságú elválasztástechnikai eljárásokat dolgoztam ki a TCR/CD3 fehérjekomplex szintetikus fragmenseinek, ill. foszfopeptidjeinek tisztaságellenőrzésére. Megállapítottam, hogy a MEKC kitűnően alkalmazható foszfopeptidek vizsgálatára. Kimutattam, hogy a TCR/CD3 ζ -láncának konzervált régiójából 6 peptid szubsztrátja az *src* kinázoknak.
5. Új, citotoxikus csoportot tartalmazó LH-RH agonista (17 db) és antagonistá (17 db) decapeptidet állítottam elő, melyek közül számos, antrakinon-származékot, metotrexátot, ciklopropil-csoportot tartalmazó analóg emlő- és prosztatacarcinóma sejtvonalakon, ill. *in vivo* is jelentős tumorellenes hatással rendelkezik. Rövidített hexa- és heptapeptid analógok (21 db) is kötődnek a hormon receptorához és emlőcarcinóma sejtvonalon tumornövekedést gátló hatással rendelkeznek.
6. A nagy érzékenységű kapilláris LC-MS mérésekhez kapilláris HPLC és CEC oszlopokat készítettem és kifejlesztettünk egy statikus és egy dinamikus nano- és

mikroESI tömegspektrometriás ionforrásokot. 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.

7. Kimutattam, hogy az ESI ionizáció alkalmasabb technika az peptidek vizsgálatára, mint az APCI, mert használatával lényegesen kevesebb bomlás történik: az ESI „lágyabb” ionizációs módszer. További előnye, hogy peptidek mérésére közel két nagyságrenddel érzékenyebb, ami mikroESI forrás alkalmazásával tovább fokozható.
8. IAMC-MS rendszert dolgoztunk ki vegyületek foszfolipofilicitásának gyors meghatározására, lecserélve az eredeti Dubbelco-puffert illékony komponensű oldatra. Az új módszer lehetővé teszi több vegyület MS-detektálással történő egyidejű analízisét. Sikeresen alkalmaztam az eljárást danzilezett tripeptid-analógok foszfolipofilicitásának meghatározására.
9. Potenciális gyógyszerjelöltek kutatásához elkészített peptidkönyvtárak vizsgálatára MS, LC-MS és LC-MS/MS módszereket fejlesztettem 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.
10. 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.
11. A világon először mutattam ki, hogy a neurohipofízis nem csak a hipotalamikus eredetű oxitocin és vazopresszin tároló szerve, hanem önmaga is képes termelni a két hormont.
12. Igazoltuk, hogy a lucerna sejtekben kimutatható ciklin-függő kináz-inhibitor azonos az ubiquitinnel.
13. *S. griseus*-ból elsőként határoztuk meg egy sejtdifferenciálódást kiváltó autoregulátor fehérje, a C-faktor aminosavszekvenciáját.
14. Tömegspektrometriás vizsgálatokkal felderítettem a hepatitis B vírus X-fehérjéjének szerkezetét, a diszulfidhidak elrendeződését.

15. Epitóptérképezéssel meghatároztam, hogy a HBxAg-vel szemben termelt monoklonális antitestek az antigén melyik epitópját kötik.
16. Proteomikai kísérleteink eredményei alapján a 2D-PAGE fehérjeanalízis jól reprodukálható módszer fehérjék expressziójának meghatározására. Megállapítottuk, hogy a 2D-PAGE alapján történő fehérjeprofил-változás kvantitatív meghatározásánál nem az egy kísérleti csoportban lévő állatok 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.
17. 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. Eljárásunkkal kiváló eszköz került a biológusok kezébe a fehérjeexpresszió pontosabb meghatározására.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. A *S. cerevisiae* riboszómális Rli1 fehérjével kölcsönható fehérjék azonosításával és további kísérletekkel bebizonyítottuk, hogy az Rli1p, mint Fe/S fehérje alapvető szerepet játszik a riboszómák érésében és működésében.
22. 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.

23. Proteomikai fehérjeazonosítással megállapítottuk, hogy programozott sejthalál tanulmányozására használt *C. elegans* fonalféregben a transzglutamináz enzim szubsztátjai az enoláz és a mitokondriális ATP-szintáz alfa-1 alegység fehérjék.
24. A betegségek hátterében 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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, valamint az általa okozott fehérjeexpresszió-változásokat. Kísérleteinkből arra következtettünk, hogy az elsősorban a riboszómális fehérjeszintézis, a mitokondriális energiatermelő folyamatok és a citoskeletális szerveződés gátlásán keresztül fejti ki neurotoxikus hatását.
28. 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.

6. 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 sejtvonalon tumorelles hatásának bizonyultak.
3. A nagy érzékenységű 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 gyógyszerkutatásban.
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 ösztadiol állatkísérletben kivédi az amiloid neurotoxikus hatását.

7. EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA

Jelen disszertáció a kandidátusi fokozat elnyerése óta eltelt idő eredményeit összegezi. Mindenképpen tudományos munkásságomhoz tartozik az azt megelőző időszakban végzett munka, különösen akkor, ha bizonyos eredményeket a kandidátusi disszertációban nem tárgyaltam és ráadásul jelentős gazdasági hasznot, ill. megtakarítást hozott.

A Szegedi Orvostudományi Egyetem I. Belgyógyászati Klinika Önálló Endokrinológiai Osztályán a 70-as évek kezdetétől az országban a legmagasabb szintű és nemzetközileg is elismert gyógyító és kutatómunka folyt. Köszönhető volt ez a kiváló laboratóriumi háttérnek, ahol az endokrinológiai betegségek diagnosztikájához nélkülözhetetlen hormonok mérését végeztük. A laboratóriumunkban előállítottunk számos szteroid (ösztрон, ösztradiol, ösztriol, progeszteron, 17OH-progeszteron, tesztoszteron és androszt-4-én-3,17-dion) és peptidhormon (oxitocin, vazopresszin, adrenokortikotróp hormon) radioimmunoassay-vel történő meghatározásához szükséges antiszérumokat és kb. 15 éven keresztül több ezer hormon-vizsgálatot végeztünk. Mindezzel sok millió forintnyi „valutát” takarítottunk meg.

A progeszteron meghatározására kidolgozott radioimmunoassay módszerünk állatgyógyászati célra történő alkalmazását szabadalmaztattuk [LIX]. Szarvasmarhák tejében, ill. sertések vérében mért progeszteron-szint alapján 4-6 héttel hamarabb meg tudtuk határozni a mesterséges megtermékenyítés sikerét vagy kudarcát, mint az a tradicionális módon megállapítható volt. Így a tehenek és kocák ismételt mesterséges megtermékenyítéséhez nem kellett a fenti időtartamot kivárni, ezáltal lerövidülhetett a két vemhesség közötti periódus. Eljárásunk alkalmazásával a Mezőhegyesi Mezőgazdasági Kombinát jelentős hasznot könyvelhetett el.

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 (mozgékonyági) zavarok diagnosztikájában. Amint azt a 2.3.1. fejezetben bemutattam, alkalmas módszert dolgoztunk ki nagyobb mennyiségű caerulein-szulfátészter szintézisére és tisztítására. Az általunk előállított peptidet Dr. Légrády Péter és munkacsoportja (Budapest) sok ezer epebántalmakban szenvedő beteg vizsgálatában használta 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 [LX], de az általam előállított hatékonyabb peptidek csak „back up” molekulák maradtak [LXI]. A citotoxikus csoportokat azért építettünk be LH-RH és szomatostatín analógokba, hogy a peptidek tumorelles hatását tovább fokozzuk, valamint hogy megnöveljük a citotoxikus szer célba jutásának valószínűségét [XVII, LVII].

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

A Hepatitis B vírus X-fehérjéjének előállítása, szerkezetének meghatározása, az ellene készült antitest építésszerkezetének felderítése egy diagnosztikai kit kifejlesztése érdekében történtek [XXVIII, XXIX].

A szegedi Gabonatermesztési Kutató Kht. néhány transzgén búzáiról megállapítottuk, hogy szárazság hatására bennük nagy mennyiségű allergén α -amiláz/tripszin inhibitorok termelődnek, ezért nem alkalmasak további termesztésre. Vizsgálataink nagy jelentőségűek az emberi fogyasztásra, ill. diétára nem ajánlott gabonafélék és pszeudocereálék kiszűrésére [XXXV, XXXVI].

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 [XLVII].

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 [LIII, LV, LVI, LVII].

Köszönetnyilvánítás

Időben elsőnek Dr. Faredin Imrének, a biológiai tudományok doktorának mondok köszönetet, aki megismertetett a szteroid hormonokkal, bevezetett a korszerű bioanalitika birodalmába és munkámat a lehető legjobb indulattal támogatta.

Dr. László Ferenc, az orvostudományok doktora az SzTE Önálló Endokrinológiai Osztály és Laboratórium vezetője volt hosszú éveken keresztül. Megmutatta, hogy a peptid és fehérjehormonok talán még a szteroidoknál is érdekesebbek. Köszönöm, hogy témavezetőm volt, ösztönözte és támogatta munkámat és segítette az életemet.

Ezúton mondok köszönetet az SzTE Orvosi Vegytani Intézet volt és jelenlegi vezetőinek, Dr. Penke Botondnak és Dr. Tóth Gábornak, a kémiai tudományok doktorainak, hogy megértették az analitika jelentőségét a peptid és fehérjekémiában és maximálisan támogatták ilyen irányú törekvéseimet. Köszönöm nekik közel 40 éves barátságukat.

Itt mondok köszönetet Dr. Jean-Louis Morgat-nak, a gif-sur-Yvette-i (Franciaország) Atomenergiái Kutatóközpont laboratóriumvezetőjének, a Nobel-díjas Dr. Andrew Victor Schally-nek, a Tulane Egyetem (New Orleans, USA) Endokrin és Polipeptid Intézet igazgatójának, Dr. Prókai Lászlónak, a Florida Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar, Orvosi Kémiai Intézet vezetőjének, hogy külföldi tanulmányutaimon megteremtették a lehetőséget a gondtalan, legkorszerűbb körülmények között végezhető munkára. Ezek a tanulmányutak tudományos pályafutásom meghatározó lépcsőfokai voltak.

Az elmúlt évek közös és eredményes munkájáért kutatócsoportom tagjainak: Földi Istvánnak, Dr. Kele Zoltánnak, Dr. Szabó Pálnak, Dr. Szabó Zoltánnak és Szeliné Szomor Juditnak és Dr. Virók Dezsőnek tartozom köszönettel. Külön köszönetet érdemel közvetlen asszisztensnőm, Dr. Ábrahámné Szendrei Rita, akivel 20 év óta fél szavakból is megértjük egymást.

Munkám jelentős része együttműködésben készült, ezért köszönöm Dr. Bíró Sándor, Dr. Hajós Gyöngyi, Dr. Juhász Gábor, Dr. Kispál Gyula, Dr. Molnár János, Dr. Orosz Antal és Dr. Sümegi Balázs kooperáló partnereimnek, hogy felismerték a proteomika jelentőségét a korszerű biológiai, orvostudományi, mezőgazdasági és gyógyszeripari kutatásokban, és így sikeresen használhattuk ki proteomikai laboratóriumunk lehetőségeit.

Köszönöm továbbá az SzTE Orvosi Vegytani Intézet minden dolgozójának azt segítséget, biztatást és türelmet, melyet tőlük a dolgozós hétköznapiakban kaptam.

Végül, de nem utolsósorban hálával tartozom feleségemnek a nyugodt otthon biztosításáért, hogy gyerekeimmel együtt alkalmazkodva segítette tudományos pályafutásom.

A disszertációban felhasznált saját közlemények listája

- [I] Szókán Gy., Janáky T.
A kémia újabb eredményei 79. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia a peptidkémiaiában.
Akadémiai Kiadó, Budapest, pp 1-221, 1995.
- [II] 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.
- [III] 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.
- [IV] Balásperi L., Blazsó G., **Janáky T.**, Kása P., Mák M., Rill A., Ötvös L.
Synthesis and biology of human galanins and some of their segments: Structure-activity
relationships.
in: Peptides 1994. Eds. Maia, H.L.S., Escom Science Publ., Leiden, 1995, p. 595-596.
- [V] **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.
- [VI] Balásperi L., **Janáky T.**, Tegyei Zs., Krajcsovits F., Blazsó G., Mák M., Takács T., Kása P.:
Solid-Phase Synthesis of new Galanins, their Segments. and Analogs. Structure-Activity
Relationships.
in: Solid-Phase Synthesis and Combinational Chemical Libraries. Proceedings of the 5th
International Symposium on Innovation and Perspectives in Solid-Phase Synthesis. (Epton, R. Ed.),
London, England, p. 55-58. (1998).
- [VII] 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.
- [VIII] 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.
- [IX] 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.
- [X] Balásperi L., **Janáky T.**, Kása P., Tóth K.G., Blazsó G., Mák M.:
Effect of Synthetic Galanins (GALs) and their Fragments on the Contractile Action and the release
of Acetylcholine (ACh) in rat brain. Some S.A.R. Studies.
in: (J.Martinez and J-A. Ferentz, Eds.). Peptides 2000. Proceedings of the 26th. European Peptide
Symposium, Montpellier, France p. 581-582, 2001.
- [XI] Szókán Gy., **Janáky T.**, Krizsán K.:
Retenciós idő tervezése (Predikciós módszerek a peptid HPLC-ben)
Kém. Közl. 79, 121-138, 1994.
- [XII] Tóth G.K., Váradi G., **Janáky T.**, Penke B., Láng E., Ötvös L., Hegedűs Z., Monostori É.:
Synthesis of phosphotyrosine-containing peptides: Comparison of different methods and their use to
investigate cell signalling via the T-cell receptor.
in: Peptides 1994. Eds. Maia, H.L.S., Escom Science Publ., Leiden, 1995, p. 743-744.
- [XIII] 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.

- [XIV] 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).
- [XV] **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.
- [XVI] **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.
- [XVII] 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.
- [XVIII] **Janáky T.**, Juhász A., Bajusz S., Schally A.V.
Luteinizing hormone releasing hormone analogs with cytotoxic moiety.
Szabadalom: Lajstromszám: US6214969, Közzététel éve: 2001
- [XIX] **Janáky T.**, Szabó E. Penke B.
How capillary electrophoresis helps to evaluate the efficiency of the preparative HPLC purification of peptides.
In: 23rd European Peptide Symposium. Braga, Portugália, 1994.09.04-1994.09.10.
Braga: p. 3-100. Paper P169.
- [XX] 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.
- [XXI] 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.
- [XXII] 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.
- [XXIII] 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.
- [XXIV] **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.
- [XXV] 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.
- [XXVI] 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.

- [XXVII] Szabó P.T., Kele Z., Birkó Zs., Szeszák F., Bíró S., **Janáky T.**
Identification of Factor C protein by electrospray mass spectrometry.
J. Mass Spectrom. 34, 1312-1316, 1999.
- [XXVIII] 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.
- [XXIX] 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.
- [XXX] 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.
- [XXXI] 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.
- [XXXII] 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.
- [XXXIII] 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)
- [XXXIV] 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.
- [XXXV] Horváth-Szanics 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.
- [XXXVI] 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.
- [XXXVII] 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.
- [XXXVIII] 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.
- [XXXIX] 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): szerkezetétől a funkcióig.
Biokémia 27, 88-95, 2003.
- [XL] 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.

- [XLI] 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.
- [XLII] 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.
- [XLIII] 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.
- [XLIV] 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.
- [XLV] 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.
- [XLVI] **Janáky T.**
Proteomika és szerepe a biomarkerkutatásban.
Gyógyszerészet 56, 406-413, 2010.
- [XLVII] 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.
- [XLVIII] 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.
- [XLIX] 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.
- [L] 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.
- [LI] 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.
- [LII] Skuta G., Fischer G.M., **Janáky T.**, Kele Z., Szabó P., Tőzsér 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.
- [LIII] Verdier Y., Huszar E., Penke B., Penke Z., Woffendin G., Scigelova M., Fülöp L., Szűcs M., Medzihradszky K., **Janáky T.**:
Identification of synaptic plasma membrane proteins co-precipitated with fibrillar beta-amyloid peptide.
J Neurochem. 94, 617-628, 2005.
- [LIV] 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.

- [LV] 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.
- [LVI] 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.
- [LVII] Szegő E.M., Csorba A., **Janáky T.**, Kékesi K.A., 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.
- [LVIII] 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.
- [LIX] László F.A., Faredin I., Tóth I., **Janáky T.**, Antal T., Faluhelyi S., Szabó I., Tekeres A.:
Eljárás szarvasmarhák vemhességének korai megállapítására.
Szabadalom: Lajstromszám: 183435, Ügyszám: P8101331, Közzététel éve: 1983
- [LX] Bajusz S., Csernus V.J., **Janáky T.**, Bokser L., Fekete M., Schally A.V.
New antagonists of LH-RH. II. Inhibition and potentiation of LH-RH by closely related analogues.
Int. J. Pept. Prot. Res. 32, 425-435, 1988.
- [LXI] **Janáky T.**, Juhász A., Schally A.V.
LHRH antagonists.
Szabadalom: Lajstromszám: US5171835, Közzététel éve: 1992.
- [LXII] Schally A.V., **Janaky T.**, Cai R.Z.
Somatostatin Analogues.
Szabadalom: Lajstromszám: EP 0450480 (A2), Közzététel éve: 1995

Felhasznált irodalom

- [1] Tswett M.: Ber. Dtsch. Botan. Ges. 24:316-326, 384-393, 1906.
- [2] Martin A.P.J., Syngé R.L.M.: Biochem. J. 35, 1358-1368, 1941.
- [3] Consden R., Gordon A.H., Martin A.P.J.: Biochem. J. 38, 224-232, 1944.
- [4] Taylor T.I., Urey H.C.: J. Chem. Phys. 6, 429-438, 1938.
- [5] James A.T., Martin A.P.J.: Biochem. J. 50, 679-690, 1952.
- [6] Kirchner J.G., Miller J.M., Keller G.: Anal. Chem. 23:420-425, 1951.
- [7] Porath J., Flodin P.: Nature (London) 183, 1657-1659, 1959.
- [8] Horváth Cs., Preiss B.A., Lipsky S.R.: Anal. Chem. 39, 1422-1428, 1967.
- [9] Horváth Cs. (ed.): High-Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives; vol.3, Academic Press, New York, pp. 321, 1986.
- [10] Aguilar M-I.(ed.): HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols, Methods In Molecular Biology vol. 251, Humana Press, New York, pp. 428, 2004.
- [11] Vámos E. (szerk.): Kromatográfia, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1959.
- [12] Ahuja S., Jespersen N. (eds.): in: Comprehensive Analytical Chemistry, Vol. 47, Modern Instrumental Analysis, pp.485-599, Elsevier, Amsterdam, 2006.
- [13] Kirkland J.J.: J. Chromatogr. Sci. 9, 206, 1971.
- [14] Tiselius A.: Transactions of the Faraday Society 33, 0524-0530, 1937.
- [15] Levy A.L.: Nature Lond. 174, 126-127, 1954.
- [16] Consden R., Gordon A.H., Martin A.P.J.: Biochem. J. 40, 33-41, 1946.
- [17] Smithies O.: Biochem. J. 61, 629-641, 1955.
- [18] Smithies O., Poulik M.D.: Nature 177, 1033, 1956.
- [19] Shapiro A.L., Vinuela E., Maizel J.V.Jr.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 28, 815-820, 1967.
- [20] O'Farrell P.H.: J. Biol. Chem. 250, 4007-4021, 1975.
- [21] Bjellqvist B., Ek K., Righetti P.G., Gianazza E., Gorg A., Westermeier R., Postel W.: Biochem. Biophys. Methods. 6, 317-339, 1982.
- [22] Jorgenson J. W., Lukacs K. D.: Anal. Chem. 53, 1298-1302, 1981.
- [23] Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A., Ando T.: Anal. Chem. 56, 111-113, 1984.
- [24] Pretorius V., Hopkins B.J., Schieke J.D.: J. Chromatogr. 99, 23-30, 1974.
- [25] Adu J.K., Euerby M.R., Tetley J.N.A., Skellern G.G.: in: Separation Science And Technology Vol. 9.: Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis (Ahuja S., Jimidar M.I., eds), Elsevier, Amsterdam, pp. 439-476, 2008..
- [26] Svec F., Majors R.E.: LC-GC North America December 1, 2009.
- [27] Venter J.C., et al, Science 291, 1304-1351, 2001.
- [28] Miller C., Rivier J.: Biopolymers (Peptide Science) 40, 265-317, 1996.
- [29] Rzeszutarski W. J., Mauger A.B.: J. Chrom. 86, 243-249, 1973.
- [30] Tsuji K., Robertson J.H., Bach J.A.: J. Chrom. 99, 597-608, 1974.
- [31] Tsuji K., Robertson J.H.: J. Chromatogr. 112, 663-672, 1975.
- [32] Gil, E.: in Peptides 1974, ed. Wollman Y.: Acad. Press, New York, p. 247-256, 1975.
- [33] Gabriel T.F., Michalewsky J., Meienhofer J.: J. Chrom. 129, 287-293, 1976.
- [34] Burgus R., Rivier J.: in Peptides 1976, Fourteenth European Peptide Symposium, Loffet A., Ed., Bruxelles, Belgium, pp. 85-94, 1976.
- [35] Hancock W.S., Bishop C.A., Prestige R.L., Harding D.R.K., Hearn M.T.W.: Science 200, 1168-1170, 1978.
- [36] Nice E.C., Capp M., O'Hare M.J.: J. Chromatogr. 185: 413-427, 1979.
- [37] Bennet H.P.J., Hudson H.M., McMartin C., Purdon G.E.: Biochem. J. 168, 9-13, 1977.
- [38] Rivier J.: J. Liquid Chromatogr., 1, 343-366, 1978.
- [39] Mant C.T., Hodges R.S., in: High-performance liquid chromatography of peptides and proteins: Separation, analysis and conformation (Mant C.T., Hodges R.S., eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 327-341. 1991.
- [40] Hancock W.S., ed.: CRC handbook of HPLC for the separation of amino acids, peptides and proteins. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1984.
- [41] Kašička V.: Electrophoresis 29, 179-206, 2008.
- [42] Kašička V.: Electrophoresis 31, 122-46, 2010.
- [43] Anastasi A., Erspamer V., Endean R.: Experientia 23, 699-700, 1967.
- [44] Erspamer V., Bertaccini G., De Caro G., Endean R.: Experientia 23, 702-703, 1967.
- [45] De Castiglione R.: Biopolymers 22, 507-515, 1983.

- [46] Bernardi L., Bertaccini G., Bosisio G., De Castiglione R., Espamer V., Goffredo O., Impicciatore M.: *Experientia* 23, 771-773, 1967.
- [47] Morley J.S.: in: *Peptides 1968*, (Bricas E., ed.), North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 251-255, 1968.
- [48] Penke B., Zarándi M., Kovács K., Fekete M., Telegdy G., Pham P.: in „*Peptides 1982*”, (eds. Bláha K., Malon V.), Walter de Gruyter, Berlin-New-York, pp. 569-575, 1983.
- [49] Valdivia H.H., Smith J.S., Martin B.M., Coronado R., Possani LD.: *FEBS Lett.* 226, 280-264, 1988.
- [50] Lambert P., Kuroda H., Chino N., Watanabe T. X., Kimura T., Sakakibara S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170. 684-690, 1990.
- [51] Vita C., Bontems F., Bouet F., Tauc M., Poujeol P., Vatanpour H., Harvey A.L., Menez A., Toma F.: *Eur. J. Biochem.* 217, 157-169, 1993.
- [52] Tatemoto K., Rökaeus A., Jörnvall H., McDonald T.J., Mutt V.: *FEBS Lett.* 164, 124-128, 1983.
- [53] Hökfelt T., Tatemoto K.: *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1793-1795, 2008.
- [54] Wang Y., Conlon J.M.: *Peptides* 15, 603-606, 1994.
- [55] Bartfai T.: in: *Psychopharmacology - 4th Generation of Progress*, Am. Coll. Neuropsychopharm. Brentwood, 2000.
- [56] Walton K.M., Chin J.E., Duplantier A.J., Mather R.J.: *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 9, 560-70, 2006.
- [57] Takács T., Hegyi P., Czákó L., Balásperi L., Lonovics J.: *J. Experimental Medicine*, 189, 275-283, 2000.
- [58] Kása P., Farkas Z., Balásperi L., Wolff J.R.: *Neuroscience* 72, 709-723, 1996.
- [59] Gálfi M., Balásperi L., Tóth I., Pávó I., Csajbók É., László F., Morschl É., Varga Cs., László F.A.: *Regul. Peptides*, 116, 35-34, 2003.
- [60] Wilce M.C.J., Aguilar M.I., Hearn M.T.W.: *Anal. Chem.* 67, 1210-1219, 1995.
- [61] Mant C.T., Kovacs J.M., Kim H.M., Pollock D.D., Hodges R.S.: *Biopolymers* 92, 573-595, 2009.
- [62] Parker J.M.R., Guo D., Hodges R.S.: *Biochemistry* 25, 5425-5432, 1988.
- [63] Hodges R.S., Zhub B.Y., Zhou N.E., Mant C.T.: *J. Chrom. A.* 676, 3-15, 1994.
- [64] Rose G.D., Wolfenden R.: *Annu. Rev. Biomol. Struct.* 22, 381-415, 1993.
- [65] Bull H.B., Breese K.: *Arc. Biochem. Biophys.* 161, 665-670, 1974.
- [66] Meek J.L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1632-1636, 1980.
- [67] Rekker R.F.: *The Hydrophobic Fragmental Constant*, Elsevier, Amsterdam, p. 301, 1977.
- [68] Rickard E.C., Strohl M.M., Nielsen R.G.: *Anal. Biochem.* 197, 197-207, 1991.
- [69] Issaq H.J., Janini G.M., Atamna I.Z., Muschik G.M., Lukszo J.: *J. Liq. Chromatogr.* 14, 817-845, 1991.
- [70] June, C.H., Fletcher M.C., Ledbetter J.A., Shieven G.L., Siegel J.N., Phillips A.F., Samelson L.E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7722-7726, 1990.
- [71] Samelson L.E., Klausner R.D.: *J. Biol. Chem.* 267, 24913-24916, 1992.
- [72] Akira O., Saburo A.: *Protein, Nucleic Acid and Enzyme* 44, 606-613, 1999.
- [73] Kupihár Z., Váradi Gy., Monostori É., Tóth G.K.: *Tetrahedron Letters* 41, 4457-4461, 2000.
- [74] Yoo Y.S., Han Y.S., Suh M.J., Park J.: *J. Chrom. A* 763, 285-293, 1997.
- [75] Seeburg P.H., Mason A.J., Stewart T.A., Nikolics K.: *Rec. Prog. Horm. Res.* 43, 69-98, 1987.
- [76] Knobil E., Plant T.M., Wildt L., Belchetz P.E., Marshall G.R.: *Rec. Prog. Horm. Res.* 36, 53-88, 1980.
- [77] Schally A.V., Arimura A., Baba Y., Nair R.M.G., Matsuo H., Redding T.W., Debeljuk L., White W.F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 393-399, 1971.
- [78] Amoss M., Burgus R., Blackwell R., Wale W., Fellows R., Guillemin R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 205-210, 1971.
- [79] Dutta A. S.: *Drugs Future* 13, 43-57, 1988.
- [80] Limonta P., Moretti R.M., Marelli M.M., Motta M.: *Frontiers in Neuroendocrinology* 4, 279-295, 2003.
- [81] Engel J.B., Schally A.V.: *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 3, 157-167, 2007.
- [82] Limonta P.; Marelli M.M.; Moretti R.M.: *Expert Opinion on Investigational Drugs* 10, 709-720, 2001.
- [83] Dutta A. S.: *Drugs Future* 13, 761-787, 1988.
- [84] Boccon-Gibod L., van der Meulen E., Persson B.E.: *Therap. Adv. Urology* 3, 127-140, 2011.
- [85] Jackson I.M., Matthews M.J., Diver J.M.J.: *Cancer Treat. Rev.* 16, 161-175, 1989.
- [86] Vickery B.H.: *Endocr. Rev.* 7, 115-124, 1986.
- [87] Eidne K.A., Flanagan C.A., Millar P.P.: *Science* 229, 989-991, 1985.
- [88] Schally A.V., Nagy A.: *Eur. J. Endocrinol.* 141, 1-14, 1999.
- [89] Pollak M.N., Perdu J.F., Margolese R.G., Baer K., Richard M.: *Cancer Letters* 23, 223-230, 1987.
- [90] Emons G., Pahwa G.S., Brack C., Sturm R., Oberheuser F., Knunppen G.: *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 25, 215-221, 1989.
- [91] Fekete M., Zalatnai A., Comaru-Schally A.M., Schally A.V.: *Pancreas* 4, 521-528, 1989.
- [92] Badr M., Pelletier G.: *Neuroendocr.* 1, 141-146, 1989.

- [93] Colvin M.: in: Pharmacological principles of cancer treatment, (Chabner B.A. ed.), W.B. Saunders Co., Philadelphia, p. 276-308, 1982.
- [94] DiMarco A.: Anthracyclin antibiotics. In: Cancer medicine, (Holland J.F., Frei E. eds), Lea & Febiger, Philadelphia, p. 872-906, 1982.
- [95] Gosh M.K., Kildsig D.O., Mitra A.K.: Drug Des. Deliv. 4, 13-35, 1989.
- [96] Kun-hwa H., Marshall G.R.: J. Med. Chem. 24, 1304-1310, 1981.
- [97] Nagy A., Schally A.V., Halmos G., Armatis P., Cai R.Z., Csernus V., Kovács M., Koppán M., Szepesházi K., Kahán Zs.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1794-1799, 1998.
- [98] Thomson J.J.: Rays of Positive Electricity and Their Application to Chemical Analysis, Longmans Green, London, 1913.
- [99] Andersson C.O.: Acta. Chem. Scand. 12, 1353, 1958.
- [100] Cameron A.E., Eggers D.F.: Rev. Sci. Instrum., 19, 605, 1948.
- [101] Sommer H., Thomas H.A., Hipple J.A.: Phys. Rev. 76, 1877, 1949.
- [102] Johnson E.G., Nier A.O.: Phys. Rev. 91, 12, 1953.
- [103] Paul W., Steinwedel H.S.: Z. Naturforsch., 8a, 448, 1953.
- [104] McLafferty, F.W.: Appl. Spectrosc., 11, 148, 1956.
- [105] Arpino, P.J., Baldwin, M.A., McLafferty, F.W.: Biomed. Mass Spectrom., 1, 80, 1974.
- [106] Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M.: Science, 246, 64-71, 1989.
- [107] Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp, F.: Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 78, 53, 1987.
- [108] Aebersold R., Mann M.: Nature, 422, 198-207, 2003.
- [109] Standing K.G.: Curr. Opin. Struct. Biol., 13, 595-601, 2003.
- [110] Sechi S., Oda Y.: Curr. Opin. Chem. Biol., 7, 70-7, 2003.
- [111] Jensen O.N.: Curr. Opin. Chem. Biol., 8, 33-41, 2004.
- [112] Meng F.Y., Forbes A.J., Miller L.M., Kelleher N.L.: Mass. Spectrom. Rev., 24, 126-34, 2005.
- [113] Medzihradszky K.F.: in: Methods in Enzymology, Biological Mass Spectrometry, vol.204, (ed. Burlingame A.L.), Academic Press, New York, pp. 209-44, 2005.
- [114] Hernandez P., Muller M., Appel R.D.: Mass Spectrom. Rev., 25, 235-54, 2006.
- [115] Roepstorff P., Fohlman J.: Biomed. Mass Spectrom., 11, 601, 1984 and 12, 631, 1985.
- [116] Biemann K.: Biomed. Environ. Mass Spectrom., 16, 99, 1988.
- [117] Niessen W.M.A., Liquid Chromatography - Mass Spectrometry, Chromatographic Science Series, No. 79, Marcel Dekker, New York, 1999.
- [118] Hopfgartner G., Wachs T., Bean K., Henion J.: Anal.Chem. 65, 439, 1993.
- [119] Abian J., Oosterkamp A.J., Gelpi E.: J. Mass Spectrom. 34, 244-254, 1999.
- [120] Valaskovic G.A., Keheller N.H., Little D.P., Aaserud D.J., McLafferty F.W.: Anal.Chem. 67, 3802, 1995.
- [121] Lancas F.M., Rodrigues J., Freitas S.D.: J. Separat. Sci. 27, 1475-1482, 2004.
- [122] Siouffi A.M.: J. Chromatogr. A 1000, 801-818, 2003.
- [123] Moseley M.A., Deterding L.J., Tomer K.B.: Anal. Chem. 63, 1467, 1991.
- [124] Emmett M.R., Caprioli R.M.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5, 605-613, 1994.
- [125] Wilm M.S., Mann M.: J. Mass Spectrom. Ion Proc. 136, 167-180, 1994.
- [126] Wilm M.S., Mann M.: Anal. Chem. 68 (1): 1-8, 1996.
- [127] Vanhoutte K., Van Dongen W., Esmans E.L.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 12, 15, 1998.
- [128] Taylor L.E.C., Johnson R.L., Raso R.: J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 6, 387, 1995.
- [129] Matuszewski B.K., Konstanzer M.L., Chavez-Eng C.M.: Anal. Chem. 70, 882, 1998.
- [130] Iwabuchi H., Kitazawa E., Kobayashi N., Watanabe H., Kanai N., Nakamura K.: Biol. Mass Spectrom. 23, 540, 1994.
- [131] Toussaint B., Ceccato A., Hubert P., De Graeve J., De Pauw E., Crommen J.: J. Chromatogr. A 819, 161, 1998.
- [132] Dalvie D.K., Donnell J.P.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 12, 419, 1998.
- [133] Galceran M.T., Moyano E.: J. Chromatogr. A 731, 75, 1996.
- [134] Tiller P.R., Cuniff J.B., Land A.P.: 11, 1151, 1997.
- [135] Lipinski A.C., Lombardo F., Dominy W.B., Feeney J.P.: Adv. Drug Deliv. Rev., 23, 3-25, 1997.
- [136] Valkó K.: J. Chromatogr. A, 1037, 299-310, 2004.
- [137] Braumann T.: J Chromatogr 373:191-225, 1995.
- [138] Vemuri S., Rhodes C.T.: Pharm. Acta Helv. 70, 95-111, 1995.
- [139] Pidgeon C., Ong S., Liu H., Qiu X., Pidgeon M.: J. Med. Chem. 28, 590, 1995.
- [140] Giaginis C., Tsantili-Kakoulidou A.: J. Pharm. Sci. 97, 2984, 2008.
- [141] Pardrige W.M.: Drug Discov. Today 6, 381, 2001.
- [142] Johnson M.D., Anderson D.B.: J. Pharm. Sci. 88, 620, 1999.
- [143] Kansy M., Senner F., Gubernator K.: J. Med. Chem. 41, 1007, 1998.

- [144] Korfmacher W.A., Cox K.A., Bryant M.S., Veals J., Ng K., Watkins R., Lin C.C.: *Drug Discov. Today* 2, 532, 1997.
- [145] Tamvakodopoulos C.S., Colwell L.F., Barakat K., Fenyk-Melody J., Griffin P.R., Nargund R., Palucki B., Sebhat I., Shen X., Stearn R.A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 1729, 2000.
- [146] Rodrigues A.D.: *Bichel. Biopharmacol.* 48, 2147, 1994.
- [147] Prokai L., Prokai-Tatrai K., Zharikova A., Li X., Rocca J.R.: *J. Med. Chem.* 44, 1623, 2001.
- [148] Tan P.P.C., Chen J.C., Li J.Y., Liang K.W., Wong C.H., Huang E.Y.K.: *Peptides*, 21, 205, 1999.
- [149] Boutin J.A., Lambert P.H., Bertin S., Volland J.P., Fauchere J-L.: *J. Chromatogr. B* 725, 17, 1999.
- [150] Winger B.E., Campana J.E.: *Rapid Commun Mass Spectrom.* 10, 1811, 1996.
- [151] Triolo A., Altamura M., Cardinali F., Sisto A., Maggi C.A.: *J. Mass Spectrom.* 36, 1249-1259, 2001.
- [152] Elmquist W.F., Sawchuk R.J.: *Pharm. Res.* 14, 267, 1997.
- [153] Viero C., Shibuya I., Kitamura N., Verkhatsky A., Fujihara H., Katoh A., Ueta Y., Zingg H.H., Chvatal A., Sykova E., Dayanithi G.: *CNS Neuroscience & Therapeutics* 16, e138-e156, 2010.
- [154] McEwen B.: *Advances in Pharmacology Vol 50: Roles of Vasopressin and Oxytocin in Memory Processing*, Elsevier, San Diego, p. 640, 2004.
- [155] Brownstein M.J., Russel J.T., Gainer D.H.: *Science* 207, 373, 1980.
- [156] Murphy D., Funkhouser J., Ang H.L., Foo N.C., Carter D.: *Ann. New York Acad. Sci.* 689, 91, 1993.
- [157] Mohr E., Zhou A., Thorn N.A., Richter D.: *FEBS Lett.* 263, 332, 1990.
- [158] Gainer H., Wray S.: *Ann. New York Acad. Sci.* 652, 14, 1992.
- [159] Ivell R., Furuya K., Brackmann B., Dawood Y., Khan-Dawood F.: *Endocrinology* 127, 2990-6, 1990.
- [160] Pu L.P., van Leeuwen F.W., Tracer H.L., Sonnemans M.A., Loh Y.P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10653, 1995.
- [161] Vecsernyes M., Jojart I., Pepo J., Laczi F.: *Brain Res.* 552, 325, 1990.
- [162] Laczi F., Ivanyi T., Julesz J., Janaky T., Laszlo F.A.: *Acta Endocrinologica* 113, 168, 1986.
- [163] Trembleau A., Morales M., Bloom F.E.: *Neuroscience* 70, 113, 1996.
- [164] Murphy D., Levy A., Lightman S., Carter D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9002, 1989.
- [165] Nasmyth K.: *Trends Genet.* 12, 405, 1996.
- [166] Burssens S., Van Montagu M., Inze D.: *Plant Physiol. Biochem.* 36, 9, 1998.
- [167] Peter M., Herskowitz I.: *Cell* 79, 181, 1994.
- [168] Wang H., Fowke L.C., Crosby W.L.: *Nature* 386, 451, 1997.
- [169] Magyar Z., Meszaros T., Miskolczi P., Deak M., Feher A., Brow S., Kondorosi E., Athanasiadis A., Pongor, M., Bilgin, L. Bako, Cs. Koncz, D. Dudits: *The Plant Cell* 9, 223, 1997.
- [170] Pagano M.: *FASEB J.* 11, 1067, 1997.
- [171] Berdy J.: *J. Antibiot. (Tokyo)* 58, 1-26, 2005.
- [172] Willey J.M., Nodweel J.R.: in: *Chemical communication of bacteria* ((Winans S.C., Bassler B.L., eds), ASM Press, Washington DC, pp. 91-103, 2008.
- [173] Szabó G., Vályi-Nagy T., Vitális S.: *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 18, 237-292, 1964.
- [174] Biró S., Békési I., Vitális S., Szabó G.: *Eur. J. Biochem.* 103, 359-363, 1980.
- [175] Szeszák F., Vitális S., Bíró S., Dalmi L.: *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 48, 265-273, 1997.
- [176] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
- [177] Robinson W.S.: *Ann. Rev. Med.* 45, 297, 1994.
- [178] Gupta A., Mal T.K., Jayasurian N., Chauhan V.S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 919, 1995.
- [179] Murakami S.: *J. Gastroenterol.* 36, 651-660, 2001.
- [180] Su Q., Liu J.F., Zhang J.F., Li D.F., Yang J.J.: *Hepatology* 20, 788, 1994.
- [181] Marczinovits I., Somogyi Cs., Patthy A., Németh P., Molnár J.: *J. Biotechnol.* 56, 81, 1997.
- [182] Lundegaard C., Lund O., Kesmir C., Brunak S., Nielsen M.: *Bioinformatics* 23, 3265-3275, 2007.
- [183] Fack F., Hügler-Dörr B., Song D., Queitsch I., Petersen G., Bautz E.K.F.: *J. Immunol. Meth.* 206, 43-52, 1997.
- [184] Mayrose I., Shlomi T., Rubinstein N.D., Gershoni J.M., Ruppén E., Sharan E., Pupko T.: *Nucl. Acids Res.* 35, 69-78, 2007.
- [185] Hager-Braun C., Tomer K.B.: *Exp. Rev. Proteomics* 2, 745-756, 2007.
- [186] Pál J., Somogyi C., Szmolenszky A.A., Szekeres G., Sipos J., Hegedűs G., Marczinovits I., Molnár J., Németh P.: *Pathol. Oncol. Res.* 7, 178-184, 2001.
- [187] Klampfl C.W.: *Electrophoresis* 27, 3-34, 2006.
- [188] Smith R.D., Barinaga C.J., Udseth H.R.: *Anal. Chem.* 60, 1948-1952, 1988.
- [189] Cao P., Moini M.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 8, 561-564, 1999.
- [190] Lee E.D., Muck W., Henion J.D., Covey T.R.: *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.* 18, 844, 1989.
- [191] Olivares J.A., Nguyen N.T., Yonker C.R., Smith R.D.: *Anal. Chem.* 59, 1230, 1987.

- [192] Wilkins M.R., Pasquali C., Appel R.D., Ou K., Golaz O., Sanchez J-C., Yan J.X., Gooley A.A., Hughes G., Humphery-Smith I., Williams K.L., Hochstrasser D.F.: *Nature Biotech.* 14, 61-65, 1996.
- [193] Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R., Aebersold R.: *Mol. Cell. Biol.* 19, 1720-1730, 1999.
- [194] Aebersold R., Mann M.: *Nature* 422, 198-207, 2003.
- [195] Brody E.N., Gold L., Lawn R.M., Walker J.J., Zichi D.: *Expert Rev. Mol. Diagn.* 10, 1013-22, 2010.
- [196] Mann M., Hojrup P., Roepstorff P.: *Biol Mass Spectrom* 22, 338-345, 1993.
- [197] Bodzon-Kulakowska A., Bierczynska-Krzysik A., Dylag T., Drabik A., Suder P., Noga M., Jarzebinska J., Silberring J.: *J. Chromatogr. B*, 849, 1-31, 2007.
- [198] Washburn M.P., Wolters D., Yates J.R. III : *Nature Biotechnol.* 19, 242-247, 2001.
- [199] Laemmli U.K.: *Nature* 227, 680-685, 1970.
- [200] O'Farrell P.H.: *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021, 1975.
- [201] Klose J.: *Humangenetik* 26, 231-243, 1975.
- [202] Cohen S.A., Schure M.R. (eds.): in: *Multidimensional Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, pp.456, 2008.
- [203] Vuong G.L., Weiss S.M., Kammer W., Priemer M., Vingron M., Nordheim A., Cahill M. A.: *Electrophoresis* 21, 2594-2605, 2000.
- [204] Pietrogrande M.C., Marchetti N., Dondi F., Righetti P.G.: *Electrophoresis* 24, 217-224, 2003.
- [205] Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W.: *Electrophoresis* 21 1037-1053, 2000.
- [206] Westermeier R., Naven T Höpker H-R.: in: *Proteomics in Practice*, WILEY-VCH, Weinheim, pp. 482, 2008.
- [207] Molloy M.P., Brzezinski E.E., Hang J., McDowell M.T., VanBogelen R.A.: *Proteomics* 3, 1912-1919, 2003.
- [208] Ünlü M., Morgan E.M., Minden J.S.: *Electrophoresis* 19, 2071-2077, 1997.
- [209] Winkler W., Zellner M., Diestinger M., Babelu K.R., Marchetti M., Goll A., et al.: *Mol. Cell Proteomics* 7, 193-203, 2008.
- [210] Schneider M.V., Orchard S.: *Methods Mol. Biol.* 719, 3-30. 2011.
- [211] Fenyö D.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 391-395, 2000.
- [212] Gras R., Muller M., Gasteiger E., Gay S., Binz P. A., Bienvenut W.: *Electrophoresis* 20, 3535-3550, 1999.
- [213] Yates J.R., Eng J.K., McCormack A.L.: *Anal. Chem.* 67, 3202-3210, 1995.
- [214] Boros M. (ed.): *Állatkísérletek az orvostudományban*, Egyetemi jegyzet, Szeged, 2007.
- [215] Rabilloud T., Chevallet M., Luche S., Lelong C.: *J. Proteomics* 73, 2064-2077, 2010.
- [216] Clark B.N., Gutstein H.B.: *Proteomics* 8, 197-203, 2008.
- [217] Karp N.A., McCormick P.S., Russell M.R., Lilley K.S.: *Mol Cell Proteomics* 6, 1354-1364, 2007.
- [218] Lenth R.V.: computer software. 2006-9 Retrieved 01 28, 2011, <http://www.st.at.uiowa.edu/~rlenth/Power>
- [219] Asirvatham V.S., Watson B.S., Sumner L.W.: *Proteomics* 2, 960-968, 2002.
- [220] Karp N.A., Lilley K.S.: *Proteomics* 9, 388-397, 2009.
- [221] Elliott M.H., Smith D.S., Parker C.E., Borchers C.: *J Mass Spectrom.* 44, 1637-1660, 2009.
- [222] Campostrini N., Areces L.B., Rappsilber J., Pietrogrande M.C., Dondi F., Pastorino F, et al.: *Proteomics* 5, 2385-2395, 2005.
- [223] Broedel O., Krause E., Stephanowitz H., Schuemann M., Eravci M., Weist S.: *J. Proteome Res.* 8, 3771-3177, 2009.
- [224] Havlis J., Shevchenko A.: *Anal Chem.* 76, 3029-3036, 2004.
- [225] Silva J.C., Denny R., Dorschel C.A., Gorenstein M., Kass I.J., Li G.Z., et al.: *Anal Chem.* 77, 2187-2200, 2005.
- [226] Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M.: *Nat. Protoc.* 1, 2856-2860, 2006.
- [227] Silva J.C., Gorenstein M.V., Li G.Z., Vissers J.P., Geromanos S.J.: *Mol. Cell. Proteomics* 5, 144-156, 2006.
- [228] Geiger T., Cox J., Mann M.: *Mol Cell Proteomics* 9: 2252-2261, 2010.
- [229] Lásztity, R.: *Cereal Chemistry*. Akadémia Kiadó, Budapest, 1999.
- [230] Johansson E.: *Euphytica*, 126, 143-149, 2002.
- [231] Reddy B.V.S., Reddy P.S., Bidinger F. Blümmel M.: *Field Crops Res.* 84, 57-77, 2003.
- [232] Klement Z., Farkas G., Lovrekovich L.: *Phytopathology*, 54: 474-477, 1964.
- [233] Stintzi A., Heitz T., Prasad, V. Wiedemann-Merdinoglu S., Kauffmann S., Geoffroy P., Legrand M., Fritig B.: *Biochimie* 75, 687-706, 1993.
- [234] Van Loon L.C.: *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 753-765, 1997.
- [235] Hashimoto M., Kisseleva L., Sawa S., Furukawa T., Komatsu S., Koshiba T.: *Plant Cell Physiol.* 45, 550-559, 2004.
- [236] van Loon L.C., van Strien E.A.: *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 55, 85-97, 1999.

- [237] Nelson D. E., Raghothama K. G., Singh N. K., Hasegawa P. M., Bressan R. A.: *Plant Mol. Biol.*, 19: 577-588, 1992.
- [238] Chen W., Provart N.J., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H.S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G., Whitham S.A.: *Plant Cell* 14: 559-574, 2002.
- [239] Breiteneder H., Radauer C.: *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 821-830, 2004.
- [240] Poms R. E., Anklam E.: *J. AOAC International* 87, 1466-1474, 2004.
- [241] Radauer C., Breiteneder H.: *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 518-525, 2007.
- [242] Shimada J., Yano H., Mizumachi K.: *Science & Technology Trends* 16/July, 26-35, 2005.
- [243] Picariello G., Mamone G., Addeo F., Ferranti P.: *J. Chromatogr. A* doi:10.1016/j.chroma.2011.06.033
- [244] Posch A., Weiss W., Wheeler C., Dunn MJ, Gorg A.: *Electrophoresis* 16, 1115-1119, 1995.
- [245] Weiss W., Vogelmeier C, Görg A.: *Electrophoresis*, 14, 805-815, 1993.
- [246] Mamone G, Picariello G, Addeo F, Ferranti P.: *Expert Rev Proteomics* 8, 95-115, 2011.
- [247] Petrucci T., Tomasi M., Cantagalli P., Silano V.: *Phytochemistry* 13, 2487-249, 1974.
- [248] Cornelissen B. J.C., Huijsduijn R.A.M., Bol J.F.: *Nature* 321, 531-532, 1986.
- [249] Szabó E.: *Doktori Értekezés, KÉKI, Budapest*, 2006.
- [250] Iulek J., Franco O. L., Silva M., Slivinski C. T., Bloch C., Rigden D. J., Grossi de Sá M. F.: *The Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 1195-1204, 2000..
- [251] Svensson B., Fukuda K., Nielsen P. K., Bonsager B. C.: *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics*, 1696, 145-156, 2004.
- [252] Besler M.: *Trends Anal. Chem.* 20, 662-672, 2001.
- [253] Mari A., Ciardiello M.A., Tamburrini M., Rasi C., Palazzo P.: *Expert Rev. Proteomics* 7, 723-734, 2010.
- [254] Than N.G., Bohn H., Szabó G.D.: In: *Advances in Pregnancy-Related Protein Research*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 1-333, 1993.
- [255] Bohn H.: in: *Proteins of the placenta*, (Bischof P., Klopfer A., eds.), Karger, Basel, pp. 1-25, 1965.
- [256] Bohn H.: *Arch. Gynecol. Obstet.* 248, 111-115, 1991.
- [257] Than N.G., Sumegi B., Than G.N., Kispál G., Bohn H.: *Eur. J. Biochem.*, 258: 752-757, 1998.
- [258] Than N.G., Sumegi B., Than G.N., Berente Z., Bohn H.: *Placenta*, 20: 703-710, 1999.
- [259] Than N.G., Sumegi B., Than G.N., Bellyei Sz., Bohn H.: *Placenta*, 22: 235-243, 2001.
- [260] Visegrády B., Than N.G., Kílár F., Sümegi B., Than G.N., Bohn H.: *Prot. Eng.* 14, 875-880, 2001.
- [261] Hirabayashi J. Kasai K.: *Glycobiology* 3, 297-304, 1993.
- [262] Mazurek N., Conklin J., Byrd J.C., Raz A., Bresalier R.S.: *J. Biol. Chem.* 275, 36311-36315, 2000.
- [263] Hughes R. C.: *Biochim. Biophys. Acta* 1473, 172-185, 1999..
- [264] Joubert R., Caron M., Avellana-Adalid V., Mornet D., Bladier D.: *J. Neurochem.* 58, 200-203, 1992.
- [265] Bohn H., Kraus W., Winckler W.: *Oncodev. Biol. Med.* 4, 343-350, 1993.
- [266] Than N.G., Kispál Gy., Sümegi B., Than G.N., Bohn H.: *Tumor Biol.* 18 (S2), 110, 1997.
- [267] Than N.G., Sümegi B., Than G.N., Kispál Gy., Bohn H.: *Eur. J. Biochem.* 258, 752-757, 1998.
- [268] Diaz E., Pfeffer S.R.: *Cell* 93, 433-443, 1998.
- [269] Wolins N.E., Rubin B., Brasaemle D.L.: *J. Biol. Chem.* 276, 5101-5108, 2001.
- [270] Lee L.F., Li G., Templeton D.J., Ting J.P.: *J. Biol. Chem.* 273, 28253-28260, 1998.
- [271] An G., Tesfaigzi J., Chuu Y.J., Wu R.: *J. Biol. Chem.* 268, 10977-10982, 1993.
- [272] Nosaka K., Onozuka M., Kakazu N., Hibi S., Nishimura H., Nishino H.: *Biochim. Biophys. Acta* 1517, 293-7, 2001.
- [273] Nosaka K, Onozuka M, Nishino H, Nishimura H, Kawasaki Y, Ueyama, H.: *J. Biol. Chem.* 26:34129-33, 1999.
- [274] Chen S., Bawa D., Besshoh S.: *J Neurosci Res* 81, 522-529, 2005.
- [275] Reichert A.S., Neupert W.: *Trends Genet.* 20:555-562, 2004.
- [276] Stevens B.: in: *The Molecular Biology of the Saccharomyces, Life Cycle and Inheritance*, (Strathern J.N., Jones, E.W., Broach, J.R., eds., Cold Spring Harbour Laboratory, pp. 471-504, 1981.
- [277] Lill R., Kispál G.: *Trends Biochem. Sci.* 25, 352-356, 2000.
- [278] Puig O., Caspary F., Rigaut G., Rutz B., Bouveret E., Bragado-Nilsson E., Wilm M., Seraphin B.: *Methods* 24: 218-229, 2001.
- [279] Himms-Hagen J.: *New Engl. J. Med.* 311, 1549-1558, 1984.
- [280] Cinti S.: *Proc. Nutr. Soc.* 60, 319-328, 2001.
- [281] Klingenspor M.: *Exp. Physiol.* 88.1, 141-148, 2003.
- [282] Trayhurn P. *FEBS Lett.* 104: 13-16, 1979.
- [283] Farkas V., Kelényi G., Sándor, A.: *Arch. Biochem. Biophys.* 365, 54-61, 1999.
- [284] Lóránd L., Conrad S.M.: *Cell. Biochem.* 58, 9-35, 1984.
- [285] Groenen P.J.T.A., Bloemendal H., De Jong W.W.: *Eur. J. Biochem.* 205, 671-674, 1992.
- [286] Ando Y., Imamura S., Owada M.K., Kannagi R.: *J. Biol. Chem.* 266, 1101-1108, 1991.

- [287] Aeschlimann D., Paulsson M.: Thrombosis and Haemostasis 71, 402-415, 1994.
- [288] Driscoll M.: Methods in Cell Biol. 46, Chapter 14, Academic Press, London, 1995.
- [289] Mádi A., Punyiczki M., di Rao M., Piacentini M., Fésüs, L.: Eur. J. Biochem. 253, 583-590, 1998.
- [290] Mádi A., Hoffrogge R., Blaskó B., Glocker M.O., Fésüs L.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 315,1064-9, 2004.
- [291] Brown D.: Drug Discov Today 12, 1007-1012, 2007.
- [292] Hopkins A.L.; Groom C.R.: Nat. Rev. Drug Disc. 1, 727-730, 2002.
- [293] Drews J. & Ryser S.: Nature Biotechnol. 15, 1318–1319, 1997.
- [294] Overington J.P., Al-Lazikani B., Hopkins A.L.: Nat. Rev. Drug Disc. 5, 993-996, 2006.
- [295] Zheng C.J., Han L.Y., Yap C.W., Ji Z.L., Cao Z.W., Chen Y.Z.: Pharmacol. Rev. 58, 259-279, 2006.
- [296] Lomenick B., Olsen R.W., Huang J.: ACS Chem. Biol. 6, 34-46, 2011.
- [297] Papakostas GI.: J. Clin Psychiatry. 68 Suppl 10, 11-17, 2007.
- [298] McArthur R., Borsini F.: Pharm. Biochem. Behavior 84, 436-452, 2006.
- [299] Ahmed S.S., Ahameethunisa A.R., Santosh W., Chakravarthy S., Kumar S.: BMC Syst. Biol. 5, 6-17, 2011.
- [300] Bayés A., Grant S.G.: Nat. Rev. Neurosci. 10, 635-646, 2009.
- [301] Carboni L., Piubelli C., Pozzato C., Astner H., Arba R., Righetti P.G., Hamdan, M., Domenici, E.: Neuroscience 137, 1237-1246, 2006.
- [302] Tarantino L.M., Sullivan P.F., Meltzer-Brody S.: Front. Psychiatry. 2, 44-53, 2011.
- [303] Bourin M., Petit-Demoulière B., Dhonnchadha B.N., Hascöet M.: Fundam. Clin. Pharmacol. 21, 567-574, 2007.
- [304] Pytliak M., Vargová V., Mechírová V., Felšöci M.: Physiol. Res. 60, 15-25, 2010.
- [305] Sünram-Lea S.I., Dewhurst S.A., Foster J.K.: Biol. Psychol. 77, 69-75, 2008.
- [306] Ditzen C., Varadarajulu J., Czibere L., Gonik M., Targosz B.S., Hambsch, B.: Mol. Psychiatry 1, 10-17, 2009.
- [307] Orosz A., Schrett J., Nagy J., Bartha L., Schön I., Nyéki O.: Int. J. Cancer , 60 , 82-87, 1995.
- [308] Nyéki O., Rill A., Schön I., Orosz A., Schrett J., Bartha L., et al.: J. Peptide Sci. 4, 486-495, 1998.
- [309] Buchner J.: Trends Biochem. Sci. 24, 136-141, 1999.
- [310] Neckers L., Ivy S. P.: Curr. Opin. Oncol. 15, 419-424, 2003.
- [311] Sóti Cs., Pál Cs., Papp B., Csermely P.: Curr. Opin. Cell Biol. 17, 210-215, 2005.
- [312] Wright L., Barril X., Dymock B., Sheridan L., Surgenor A., Beswick M., et al.: Chemistry and Biology , 11, 775-785, 2004.
- [313] Pearl L.H., Prodromou C.: Curr. Opin. Struct. Biol. 10, 46-51, 2000.
- [314] Kamal A., Thao L., Sensintaffar J., Zhang L., Boehm M.F., Fritz L.C., et al.: Nature 425, 407-410, 2003.
- [315] Copeland W.C., Cheng M.S., Wang TSF.: J. Biol. Chem. 267, 21459-21464, 1992.
- [316] Lerza R., Castello G., Mela G.S., Arboscello E., Cerruti A., Bogliolo G., Mencoboni M., Ballarino P., Pannacciulli I.: Exp. Hematol. 25, 252-255, 1997.
- [317] Herskowitz A., Willoughby S.B., Baughman K.L., Schulman S.P., Bartlett J.D.: Ann. Intern. Med. 116, 311-313, 1992.
- [318] Lewis L.D., Hamzeh F.M., Lietman P.S.: Antimicrob. Agents Chemother. 36, 2061-2065, 1992.
- [319] Simpson D.M., Wolfe D.E.: AIDS 5: 917-926, 1991.
- [320] Salceda S., Caro J.: J. Biol. Chem. 272, 22642-22647, 1997.
- [321] Guiang S.F., Widness J.A., Flanagan K.B., Schmidt R.L., Radmer W.J., Georgieff M.K.: J. Dev. Physiol. 19, 99-104, 1993.
- [322] Nakano M., Mann D.L., Knowlton A.: Circulation 95, 1523-1531, 1997.
- [323] Bückig A., Tikkanen R., Herzog V., Schmitz A.: Histochem. Cell Biol. 118, 353-360, 2002.
- [324] Ling Y., Morgan K., Kalsheker N.: Int. J. Biochem. Cell Biol. 35, 1505-1535, 2003.
- [325] Walsh D.M., Shankar G.M., Leissring M.A., Adame A., Sun X., Spooner E., Masliah E., Selkoe D.J., Lemere C.A.: Neurobiology of Disease 36, 293-302, 2009.
- [326] Verdier Y., Zarandi M., Penke B.: J. Pept. Sci. 10, 229-248, 2004.
- [327] Tuppo E., Arias H.R.: Int. J. Biochem. Cell Biol. 37, 289-305, 2005.
- [328] Walsh D.M., Selkoe D.J.: J. Neurochem. 101, 1172-1184, 2007.
- [329] Blanchard B.J., Chen A., Rozeboom L.M., Stafford K.A., Weigle P., Ingram V.M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 14 326-14 332, 2004.
- [330] Mungarro-Menchaca X., Ferrera P., Moran J., Arias C.: J. Neurosci. Res. 68, 89-96, 2002.
- [331] Norenberg M.D., Rao K.V.: Neurochem. Int. 50: 983-997, 2007.
- [332] Lorenzo A., Yuan M., Zhang Z. et al.: Nat. Neurosci. 3, 460-464, 2000.
- [333] Wang H.Y., Lee D.H., D'Andrea M.R., Peterson P.A., Shank R.P., Reitz A.B.: J. Biol. Chem. 275, 5626-5632, 2000.

- [334] Konno T.: *Biochemistry* 40, 2148-2154, 2001.
- [335] Ferreira A., Rapoport M.: *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 589-595, 2002.
- [336] Qin S., Hu X.Y., Xu H., Zhou J.N.: *Acta Neuropathol. (Berl.)* 107, 209-215, 2004.
- [337] Yin X., Peterson J., Gravel M., Braun P.E., Trapp B.D.: *J. Neurosci. Res.* 50, 238-247, 1997.
- [338] Torp R., Head E., Milgram N. W., Hahn F., Ottersen O.P., Cotman C. W.: *Neuroscience* 96, 495-506, 2000.
- [339] Flannery A.R., Graham L.A., Stevens T.H.: *J. Biol. Chem.* 279, 39 856-39 862, 2004.
- [340] Vitavska O., Wiczorek H., Merzendorfer H. *J. Biol. Chem.* 278, 18 499-18 505, 2003.
- [341] Oyama R., Yamamoto H., Titani K.: *Biochim. Biophys. Acta* 1479, 91-102, 2000.
- [342] Sirover M. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1432, 159-184, 1999.
- [343] Mazzola J.L., Sirover M.A.: *J. Neurosci. Res.* 71 , 279-285, 2003.
- [344] Crouch P.J., Harding S.M., White A.R., Camakaris J., Bush A.I., Masters C.L.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 181-198, 2008.
- [345] Haass C., Selkoe D.J.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101-112, 2007.
- [346] Picone P., Carrotta R., Montana G., Nobile M.R., San Biagio P.L., Di Carlo M.: *Biophys. J.* 96 , 4200-4211, 2009.
- [347] Bozsó Z., Penke B., Simon D. Laczkó I, Juhász G, Szegedi V, Kasza A, Soós K, Hetényi A, Wéber E, Tóháti H, Csete M, Zarándi M, Fülöp L.: *Peptides* 31, 248-256, 2010.
- [348] Joerchel S., Raap, M., Bigl, M., Eschrich, K., Schliebs, R.: *Int. J. Dev. Neurosci.* 26, 301-308, 2008.
- [349] Maarouf C. H., Andacht T. M., Kokjohn T. A., Castano E. M., Sue L. I., Beach, T.G., Roher, A.E.: *Curr. Alzheimer Res.* 6, 399-406, 2009.
- [350] Fu Y.J., Xiong S., Lowell M.A., Lynn B.C.: *Cell. Mol. Neurobiol.* 29, 649-664, 2009.
- [351] Robinson R.A.S., Lange M.B., Sultana R., Galvan V., Fombonne J., Gorostiza O., Zhang J., Warriar G., Cai J., Pierce W.M., Bredesen D.E., Butterfield D.A.: *Neuroscience* 177, 207-222, 2011.
- [352] Zhu H., Bilgin M., Bangham R., Hall D., Casamayor A., Bertone P., Lan N., Jansen R., Bidlingmaier S., Houfek T., Mitchell T., Miller P., Dean R.A., Gerstein M., Snyder M.: *Science.* 293(5537), 2101-5, 2001.
- [353] Schweitzer B., Predki P., Snyder M.: *Proteomics* 3, 2190-2199, 2003.
- [354] Predki P.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 8-13, 2003.
- [355] Rousseeuw P.J., Leroy A.M.: in: *Robust Regression and Outlier Detection* ; John Wiley & Sons, Inc.: New York, NY, 1987
- [356] Benjamini Y., Yekutieli D.: *Ann. Statist.* 29 1165-1188, 2001.
- [357] LaFerla F.M., Green K.N., Oddo S.: *Nature Rev. Neurosci.* 8, 499-509, 2007.
- [358] Szklarczyk D., Franceschini A., Kuhn M., Simonovic M., Roth A., Minguéz P., Doerks T., Stark M., Muller J., Bork P., Jensen L.J., von Mering C.: *Nucleic Acids Res.* 39 (Database issue), D561-8, 2011.
- [359] Hu X., Crick S.L., Bu G., Frieden C., Pappu R.V., Lee J.M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 20324-9, 2009.
- [360] Fukui H.; Moraes C. T.: 31, (5), 251-6, 2008.
- [361] DiMauro S.: *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 80-8, 2004.
- [362] Mufson E.J., Counts S.E., Perez S.E., Ginsberg S.D.: *Expert Rev. Neurother.* 8, 1703-1718, 2008.
- [363] Pike C.J., Carroll J.C., Rosario E.R., Barron A.M.: *Front. Neuroendocrinol.* 30, 239-258, 2009.
- [364] Waring S.C., Rocca W.A., Petersen R.C., O'Brien P.C., Tangalos E.G., Kokmen E.: *Neurology* 52, 965-970, 1999.
- [365] Hu L., Yue Y., Zuo P-p., Jin Z., Feng F., You H., Li M-L., Ge Q-S.: *Chin. Med. Sci. J* 21, 214-218, 2006.
- [366] Simpkins J.W., Singh M.: *Alzheimers Dement.* 4, S131-S136, 2008.
- [367] Henderson V.W., Paganini-Hill A., Miller B.L., Elble R.J., Reyes P.F., Shoupe D., McCleary C.A., Klein R.A., Hake A.M., Farlow M.R.: *Neurology* 54, 295-301, 2000.
- [368] Wang P.N., Liao S.Q., Liu R.S., Liu C.Y., Chao H.T., Lu S.R., Yu H.Y., Wang S.J., Liu H.C.: *Neurology* 54, 2061-2066, 2000.
- [369] Prókai L., Stevens S.M., Rauniyar N., Nguyen V.: *J. Proteome Res.* 8, 3862-3871, 2009.
- [370] Palkovits M.: *Brain Res.* 59: 449-450, 1973.

dc_272_11

Függelék

1. táblázat

Szintetizált galaninok HPLC, CZE és MS paraméterei, valamint biológiai aktivitásai

Peptidek	Bull-Breese összeg	HPLC* t _R (perc)	CZE** t _M (perc)	Molekulatömeg		Spazmogenikus hatás ED ₅₀ (mol/L)***		
				számolt	mért	nyúl	tengerimalac	patkány
hGAL(1-30)-OH	-22630	14,25	14,30	3157,48	3157,7	5x10 ⁻⁵	8x10 ⁻⁵	4x10 ⁻⁶
GAL(1-4)-NH ₂	-4990	10,42		476,66	477,01		4,5x10 ⁻⁵	4,5x10 ⁻⁵
GAL(1-4)-OH	-4990	10,82		475,55	475,3			
GAL(1-8)-NH ₂	-5500	10,16	18,67	803,86	804,31		3x10 ⁻⁵	5x10 ⁻⁵
GAL(1-8)-OH	-5500	10,28		804,86	805,3			
GAL(1-12)-NH ₂	-12660	14,5	22,21	1250,4	1250,5		4x10 ⁻⁶	7,5x10 ⁻⁶
GAL(1-12)-OH	-12660	14,26		1251,42	1251,39	1x10 ⁻⁷	1x10 ⁻⁷	1x10 ⁻⁷
GAL(1-15)-OH	-13960	15,67	16,80	1571,80	1572,19	1x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁶
GAL(5-8)-NH ₂	-510	3,4		346,34	346,8*			
GAL(5-8)-OH	-510	3,3		347,33	348,0*	.	1x10 ⁻⁴ -nál hatástalan	
GAL(5-12)-NH ₂	-7670	10,27		792,9	793,2			
GAL(5-12)-OH	-7670	10,3		793,88	794,0		1x10 ⁻⁴ -nál hatástalan	
GAL(9-12)-OH	-7160	9,47		464,57	465,09			
h/cs GAL(9-16)-NH ₂	-10020	11,8		868,05	868,2			
h/cs GAL(1-16)-OH	-15520	15,62		1655,90	1655,40			
h/cs GAL(1-16)-NH ₂	-15520	14,93	16,97	1654,9	1655,0			
hGAL(1-19)-OH	-15560	14,41	15,48	1964,19	1964,5	3x10 ⁻⁵	3x10 ⁻⁵	2,5x10 ⁻⁶
hGAL(16-30)-OH	-8670	9,1		1618,74	1619,06	1x10 ⁻⁴ -nál hatástalan		
hGAL(17-30)-OH	-7110	8,8	11,57	1519,61	1519,90	1x10 ⁻⁴ -nál hatástalan		
hGAL(21-30)-OH	-6950	5,1	14,53	1055,12	1055,92	1x10 ⁻⁴ -nál hatástalan		
hGAL(26-30)-OH	-3290	3,9	17,33	490,52	491,2	1x10 ⁻⁴ -nál hatástalan		

1. táblázat folytatása

Peptidek	Bull-Breese	HPLC*	CZE**	Molekulatömeg		Spazmogenikus hatás ED ₅₀ (mol/L)***		
	összeg	t _R (perc)	t _M (perc)	számolt	mért	nyúl	tengerimalac	patkány
csGAL(1-29)-NH ₂	-22630	13,70	12.3	3185,10	3185,4	2x10 ⁻⁷	1.5x10 ⁻⁷	3x10 ⁻⁷
csGAL(17-29)-OH	-4990	8,35		1543,63	1544,2			
ciklus(1-29)-NH ₂	-4990	14,00	12.43	3210,59	3210,48			
s/p GAL(1-16)-OH	-5500	14,76		1669,92	1669,92	8x10 ⁻⁷	8x10 ⁻⁷	6x10 ⁻⁷
s/p GAL(1-16)-NH ₂	-5500	15,37	17.72	1668,93	1668,6		3x10 ⁻⁶	5x10 ⁻⁶
s/p GAL(5-16)-OH	-12660	12,58	17,60	1212,38	1212,4			
pGAL(1-29)-NH ₂	-13960	14,28	12.38	3164,52	3164,4	1.5x10 ⁻⁶	1.5x10 ⁻⁶	1.5x10 ⁻⁷
pGAL(16-29)-NH ₂	-510	8,57		1624,77	1625,76	1x10 ⁻⁴ -nál hatástalan		
pGAL(20-29)-NH ₂	-510	9,5		1146,28	1146,8			
pGAL(24-29)-NH ₂	-7670	8,45		553,67	554,29			

*HPLC: 4 x 250 mm Nucleosil 5C18 (300Å) oszlop, A eluens 0,1% TFA, B eluens 0,1% TFA 80% acetonitril, grádiens: 20-80% B/30 perc, detektálás: 215 nm

**CZE: 50 µm x 50 cm kvarc kapilláris, 0,1 M foszfát puffer (pH 2,5), 15kV, 20°C

*** simaizom-görcs teszt

2. táblázat

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-R⁶(AX)-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ citotoxikus csoportot tartalmazó LH-RH analógok szerkezete, LH-felszabadító hatása és kötődésük humán mellrák sejtmembrán-receptoron

Peptidek			Retenciósidő (perc)	Relatív aktivitás	Affinitási konstans mellrák sejteken	
Kód	A	X			K _{a1} (nM ⁻¹)	K _{a2} (μM ⁻¹)
Peptidek D-Lys ⁶ -nel						
AG-1	–	–	11,3 ^a	6,9	5,88	4,21
AG-2	–	D-Mel	8,8 ^b		6,74	1,07
AG-3	A ₂ pr	(D-Mel) ₂	24,8 ^b		30,48	3,45
AG-4	–	CPC	17,6 ^a	52	1,56	–
AG-5	A ₂ pr	(CPC) ₂	20,6 ^a	25	0,14	–
AG-6	–	HMAQG	18,6 ^b	35	1,52	–
AG-7	A ₂ pr	(HMAQG) ₂	27,6 ^b	30	nk	nk
AG-8	–	DOXG	25,5 ^a	12	–	14,4
AG-9	–	MTX	17,3 ^a 17,8		5,42 0,63	1,59 –
Peptidek D-Orn ⁶ -nel						
AG-10	–	–	10,4 ^a			
AG-11	–	D-Mel	7,8 ^b		11,51	0,34
AG-12	A ₂ pr	(D-Mel) ₂	22,8 ^b		6,47	–
AG-13	–	CPC	17,8 ^a	40	–	44,2
AG-14	A ₂ pr	(CPC) ₂	19,3 ^a		nk	nk
AG-15	–	HMAQG	18,7 ^b	56	–	1,3
AG-16	A ₂ pr	(HMAQG) ₂	25,4 ^b	26		
AG-17	–	MTX	20,1 ^a 20,6			

HPLC rendszer: 4 x 250 mm W-Porex (C18, 5 μm, 300 Å), A: 0,1% TFA, B: 0,1% TFA 70% acetonitrilben, 1,2 ml/perc, 210 nm

^a Grádiens: 15-45% B, 30 perc

^b Grádiens: 35-65% B, 30 perc

3. táblázat

Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4Cl)-R³-Ser-R⁵-R⁶(AX)-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂ szerkezetű citotoxikus csoportot tartalmazó LH-RH antagonisták HPLC retenciós ideje, ovulációgátló hatása és kötődésük humán mellrák sejtmembrán-receptorokhoz

Peptidek			Retenciós idő (perc)	Ovuláció gátlás (nem ovulált/összes) %	Dózis nM	LH válasz gátlása (%)			Affinitási konstans mellrák sejteken	
kód	A	X				0 perc	30 perc	60 perc	K _{a1} (nM ⁻¹)	K _{a2} (μM ⁻¹)
Peptidek D-Pal(3) ³ -nal és Arg ⁵ -nel										
ANT-1	–	–	11,3		3	78	44	40	2.16	–
ANT-2	–	D-Mel	23,5	100 (10 μg)	3	80	71	62	0.97	1.34
ANT-3	A ₂ pr	(D-Mel) ₂	34,8		3	29	40	43	nb	nb
ANT-4	–	CPC	18,0	100 (10 μg)	1	75	58	50	nb	nb
ANT-5	A ₂ pr	(CPC) ₂	18,7	100 (10 μg)	1	60	43	32	1.52	–
ANT-6	–	HMAQG	22,8	100 (10 μg)	1	50	50	50	4.38	2.11
ANT-7	A ₂ pr	(HMAQG) ₂	45,2	40 (10 μg)	1	43	43	35	2.28	–
ANT-8	–	MTX	11,8	100 (10 μg)	3	86	33	23	0.44	1.04
Peptidek D-Trp ³ -nal és Arg ⁵ -nel										
ANT-9		–	18,8		3	45	14	8	0.65	–
ANT-10	–	D-Mel	31,2	40 (10 μg)	3	39	22	20	1.48	32.54
ANT-11	A ₂ pr	(D-Mel) ₂	47,3	20 (10 μg)	3	36	35	35	3.82	–
ANT-12	–	CPC	26,3	80 (10 μg)	1	50	25	10	nb	nb
ANT-13	A ₂ pr	(CPC) ₂	27,6	60 (10 μg)	1	45	10	0	0.42	–
ANT-14	–	HMAQG	32,8		1	27	20	15	10.2	8.60
ANT-15	A ₂ pr	(HMAQG) ₂	48,9	80 (10 μg)	3	17	20	18	83.3	0
ANT-16	–	MTX	22,1 22,4	60 (10 μg)	3	40	10	10	nk	–
Peptid D-Pal(3) ³ -nal és Tyr ⁵ -nal										
ANT-17	A ₂ pr	(HMAQG) ₂			3	0	4	14	8.33	6.66

HPLC rendszer: 4 x 250 mm W-Porex (C18, 5 μm, 300 Å), A: 0,1% TFA, B: 0,1% TFA 70% acetonitrilben, grádiens: 30-80% B, 50 perc 1,2 ml/perc, 210 nm

4. táblázat

Citotoxikus csoportot tartalmazó LH-RH agonisták és antagonisták [³H]-timidin-beépülést gátló hatása különböző humán emlő- és prosztatatrák sejtvonalakon

Peptidek			[³ H]-timidin-beépülés gátlása (%)										
Kód	X	Dózis	SKBr-3 ^a		MDA-MB-231 ^a		T-47D ^a		MCF-7 ^a		PC-3 ^b	LNCaP ^b	
			4 óra	24 óra	4 óra	24 óra	4 óra	24 óra	4 óra	24 óra	24 óra	4 óra	24 óra
AG-3	D-Mel ₂	1		30	20	15	31	15					
		10		66	20	62	39	28					
AG-6	HMAQG	1											
		10								71	51		
AG-7	HMAQG ₂	1								24			
		10								44			
AG-8	DOXG	1	27	14	20	0	32	11	19	0			
		10	24	0	9	8	44	10	34	61	6		
AG-9	MTX	1	21	16	31		38	26				24	39
		10	36	10	23		54	41			14	20	76
ANT-3	D-Mel ₂	1									30		
		10									76		
ANT-13	CPC ₂	1	37	18	25	8	44	22	25	8			
		10	42	29	73	11	50	12	34	37			
ANT-15	HMAQG ₂	1	30	9	36		37	20		30		48	59
		10	53	88	40	90	41	54		60	59	39	70
ANT-17	HMAQG ₂	1								47			
		10								71			

^a humán mellrák sejtvonal

^b humán prosztatatrák sejtvonal

5. táblázat

R¹-Ser-Tyr-R⁴(AX)-Leu-Arg-Pro-NH-Et szerkezetű citotoxikus csoportot tartalmazó LH-RH analógok HPLC retenciós ideje, kötődése, LH-válasz gátlása és [³H]-timidin-beépülést gátló hatásai MCF-7 emlőkarcinóma sejtvonalon

Peptidek				Retenciós idő (perc)	Affinitási konstans nM ⁻¹	LH válasz gátlása (%)				Citotoxikus gátlás, (%)	
Kód	R ¹	R ⁴	AX			0 perc	30 perc	60 perc	90 perc	0.5 µM	5 µM
SH-1	IA	D-Lys	–	18,0	0.11						
SH-2	IA	D-Lys	D-Mel	35,2		15	32	41	44		
SH-3	IA	D-Orn	–	17,5	0.23				–	41	45
SH-4	IA	D-Orn	D-Mel	35,2		12	33	30	41	36	50
SH-5	IA	D-Orn	HMAQG	45,2	0.025	14	21	32	–	33	47
SH-6	Ac-Trp	D-Lys	–	18,7	NK	0	18	31	38		
SH-7	Ac-Trp	D-Lys	D-Mel	35,1	NK	3	4	14	21		
SH-8	Ac-Trp	D-Lys	HMAQG	45,1		18	3	14	–		
SH-9	Ac-Trp	D-Orn	–	18,2	NK	3	7	15	0	36	45
SH-10	Ac-Trp	D-Orn	D-Mel	38,5		13	33	33	36		
SH-11	Ac-Trp	D-Orn	HMAQG	44,8		19	22	33	–	26	55
SH-12	Ac	D-Lys	–	8,9	1.6	0	12	20	27	33	57
SH-13	Ac	D-Lys	A ₂ pr	10,7		6	20	21	31	24	29
SH-14	Ac	D-Lys	Glt	14,9	NK	0	0	0	–		
SH-15	Ac	D-Lys	D-Mel	29,1		1	11	22	32		
SH-16	Ac	D-Lys	MTX		0.83	–	–	–	–	33	22
SH-17	Ac	D-Lys	Ac-Mel		0.003	–	–	–	–	38	48
SH-18	Ac	D-Lys	HMAQG	39,9	0.04	0	0	0	–	33	57
SH-19	Ac	D-Lys	DOXG		0.48	0	3	29	–	40	53
SH-20	Ac	D-Lys	A ₂ pr(PtCl ₂)		0.87	14	19	37	–		
SH-21	Ac	D-Lys	A ₂ pr(HMAQG) ₂	34,7	0.48	2	8	13	–	19	40

HPLC rendszer: 4 x 250 mm W-Porex (C18, 5 µm, 300 Å), A: 0,1% TFA, B: 0,1% TFA 70% acetonitrilben, grádiens: 20-50% B, 50 perc 1,2 ml/perc, 210 nm
NK: nincs kötés

6. táblázat

Gabonaallergiás betegek szérumai (IgE) által felismert, proteomikailag azonosított allergén fehérjék gabonafélékben és pszeudocereáliákban

Kód	Fehérje neve	Taxonómia	Mt (Da)	Peptidek száma	Szekvencia lefedettség (%)	Azonosító #
Búza fehérjék						
K1	Szerpin-Z1A	Triticum aestivum	43101,3	3	8,79	Q41593
	Tritin	Triticum aestivum	29595,2	2	9,45	Q07810
	Xilanáz inhibitor protein 1	Triticum aestivum	33257,3	4	13,20	Q8L5C6
K2	Endogenous alfa-amiláz/ subtilisin inhibitor	Triticum aestivum	19614,9	5	38,30	P16347
K3	Dimer alfa-amiláz inhibitor (fragments)	Triticum turgidum subsp. Dicoccoides	13162,9	4	47,60	A4GFN8
	Monomer alfa-amiláz inhibitor (fragments)	Triticum aestivum	13136,5	6	54,50	A4ZIW9
K4	Dimer alfa-amiláz inhibitor (fragments)	Triticum turgidum subsp. dicoccoides	13162,9	5	59,70	A4GFN8
	Monomer alfa-amiláz inhibitor (fragments)	Triticum aestivum	13136,5	6	55,40	A4ZIW9
	Wheatwin-1	Triticum aestivum	15616,2	2	11,00	O64392
K5	Endosperma transzfer sejt specifikus PR60	Triticum aestivum	11889,2	2	19,60	B2C4K0
	Monomer alfa-amiláz inhibitor (fragments)	Triticum aestivum	13136,5	2	19,00	A4ZIW9
	Nem-specifikus lipid-transzfer protein (fragments)	Triticum aestivum	11880,4	4	32,70	P24296
	Nem-specifikus lipid-transzfer protein 2G	Triticum aestivum	6960,7	4	92,50	P82900
K7	Alfa-amiláz/tripszin inhibitor CM3	Triticum aestivum	18203,2	2	19,00	P17314
	Béta-amiláz	Hordeum vulgare	59629,8	6	14,20	P16098
	Globulin 3	Triticum aestivum	66330,4	3	4,76	B7U6L4
K8	Foszfoglicerát kináz, citoszólikus	Triticum aestivum	42105,5	4	12,70	P12783
	Szerpin-Z1A	Triticum aestivum	43101,3	3	5,78	Q41593
	Szerpin-Z2A	Triticum aestivum	43294,5	2	9,30	Q9ST57
	Szerpin-Z2B	Triticum aestivum	42964,1	3	6,53	P93692

Kód	Fehérje neve	Taxonómia	Mt (Da)	Peptidek száma	Szekvencia lefedettség (%)	Azonosító #
K10	Alfa-amiláz/tripszin inhibítor CM3	Triticum aestivum	18203,2	3	28,00	P17314
	Globulin 3	Triticum aestivum	66330,4	2	2,89	B7U6L4
	Szuperoxide dizmutáz (Fragmens)	Triticum aestivum	19302,1	3	23,00	A3FKE5
K12	Szerpin-Z1A	Triticum aestivum	43101,3	5	12,30	Q41593
	Szerpin-Z1C	Triticum aestivum	42864,4	2	16,30	Q9ST58
	Szerpin-Z2B	Triticum aestivum	42964,1	7	21,60	P93692
K13	Alfa-amiláz/tripszin inhibítor CM3	Triticum aestivum	18203,2	2	19,00	P17314
	Szerpin-Z1A	Triticum aestivum	43101,3	11	35,40	Q41593
	Szerpin-Z1C	Triticum aestivum	42864,4	5	34,90	Q9ST58
	Szerpin-Z2B	Triticum aestivum	42964,1	5	17,80	P93692
K14	Alfa-amiláz/tripszin inhibítor CM16	Triticum aestivum	15764,1	2	11,90	P16159
	Alfa-amiláz/tripszin inhibítor CM2	Triticum aestivum	15441,3	4	31,70	P16851
	Alfa-amiláz/tripszin inhibítor CM3	Triticum aestivum	18203,2	7	64,30	P17314
	Dimer alfa-amiláz inhibítor (fragmens)	Triticum turgidum subsp. dicoccoides	13162,9	4	47,60	A4GFN8
K15	Alfa-amiláz/tripszin inhibítor CM16	Triticum aestivum	15764,1	3	23,10	P16159
	Alfa-amiláz/tripszin inhibítor CM2	Triticum aestivum	15441,3	2	13,80	P16851
	Alfa-amiláz/tripszin inhibítor CM3	Triticum aestivum	18203,2	5	42,30	P17314
	Dimer alfa-amiláz inhibítor (fragmens)	Triticum turgidum subsp. dicoccoides	13162,9	4	44,40	A4GFN8
	Glutenin, nagy molekulatömegű alegység 12	Triticum aestivum	69604,9	2	03,24	P08488
K16	0.19 dimer alfa-amiláz inhibítor (fragmens)	Aegilops tauschii	13300,8	2	32,30	Q5UHH1
	Alfa-amiláz/tripszin inhibítor CM16	Triticum aestivum	15764,1	2	11,90	P16159
	Alfa-amiláz/tripszin inhibítor CM3	Triticum aestivum	18203,2	3	28,60	P17314
	Avenin-szerű protein	Triticum aestivum	33013,50	2	6,53	A5A4L4
	Dimer alfa amiláz inhibítor	Eremopyrum bonaepartis	15178,9	2	38,30	C3VWV4

Kód	Fehérje neve	Taxonómia	Mt (Da)	Peptidek száma	Szekvencia lefedettség (%)	Azonosító #
	Dimer alfa-amiláz inhibitor (fragmens)	Triticum turgidum subsp. dicoccoides	13162,9	2	19,40	A4GFN8
	Glutenin, nagy molekulatömegű alegység 12	Triticum aestivum	69604,9	3	04,63	P08488
	Tripszin/alfa-amiláz inhibitor CMX2	Triticum aestivum	13813,4	2	16,50	Q43691
	Ubiquitin	Triticum aestivum	8507,2	2	32,90	P69326
Búzafehérjével keresztreakciót nem adó fehérjék						
K17	Agglutinin	Amaranthus hypochondriacus	34940,6	5	26,00	Q38719
K18	13S globulin mag tároló fehérje 2	Fagopyrum esculentum	57024,8	3	15,90	O23880
	13S globulin mag tároló fehérje 3	Fagopyrum esculentum	61145,1	10	24,20	Q9XFM4
K19	1-Cys peroxidoxin	Zea mays	24887,5	3	13,10	A2SZW8
	PER1 40S riboszomális protein S3	Zea mays	25416,9	2	11,80	B4G0E1
	Endokitináz A	Zea mays	29578,3	4	18,20	B6TEL0
	Endokitináz B (Fragmens)	Zea mays	28146,9	2	14,90	P29023
	Globulin-1 S allél	Zea mays	49945,5	6	17,30	B6UGJ0
	Glutation S transzferáz GSTF2	Zea mays	23789,8	2	09,35	B6SKA0
	Késői embriogenezis protein, csoport 3	Zea mays	22740,4	2	10,90	Q42376
	Lipoprotein	Zea mays	26205,6	2	11,30	B4FFZ9
K20	Triózfoszfát izomeráz, citoszólikus	Zea mays	27005,7	5	25,30	P12863
	Alanine aminotranszferáz	Oryza sativa subsp. japonica	52577,0	2	04,14	Q338N8
	ATP szintáz alegység Béta, mitokondriális	Oryza sativa subsp. japonica	60241,7	2	04,98	P17614
	Cupin család protein, expresszált	Oryza sativa subsp. japonica	63409,3	5	12,50	Q75GX9
	Enoláz	Oryza sativa szubszp. japonica	47955,0	5	20,00	Q42971
	Nem jellemzett protein	Oryza sativa subsp. indica	52041,9	4	13,40	B8AL97

Kód	Fehérje neve	Taxonómia	Mt (Da)	Peptidek száma	Szekvencia lefedettség (%)	Azonosító #
	UDP-glükóz pirofoszforiláz	Oryza sativa szubsp. indica	51635,9	6	17,10	A3QQQ3
Búza fehérjékkel keresztreakciót adó fehérjék						
K21	Béta-amiláz	Hordeum vulgare	59629,8	2	03,55	P16098
	Béta-amiláz (Fragments)	Secale cereale	24331,0	2	21,20	P30271
	Enoláz	Oryza sativa subsp. japonica	47955,0	2	07,40	Q42971
	Globulin 3	Triticum aestivum	66330,4	2	04,25	B7U6L4
K22	Béta-amiláz (Fragments)	Secale cereale	24331,0	2	14,40	P30271
	Foszfoglicerát kináz, citoszólikus	Triticum aestivum	42105,5	2	07,48	P12783
	Szerpin-Z1A	Triticum aestivum	43101,3	4	13,60	Q41593
K23	Globulin 3	Triticum aestivum	66330,4	2	03,23	B7U6L4
	Szerpin-Z1A	Triticum aestivum	43101,3	3	07,54	Q41593
K25	Nem jellemzett protein Sb01g039390 (Hsp70)	Sorghum bicolor	71442,6	6	11,20	C5WPE1
K26	Árpa protein Z homológ (Fragments)	Avena fatua	31095,8	4	12,10	Q9XET7
K28	Alfa-1,4-glükán-protein szintáz [UDP-forming]	Phoenix dactylifera	6829,1	2	36,70	P85413
	Aszpartát aminoszferáz, citoplazma	Oryza sativa subsp. japonica	44490,0	2	05,90	P37833
	Fruktóz- biszfoszfát aldoláz	Secale cereale	38707,1	3	10,10	C1J958
	Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz, citoszólikus	Antirrhinum majus	36667,1	3	11,90	P25861

7. táblázat

NAX és AX egerekben eltérően expresszáldott fehérjék és tulajdonságaik

Gén neve	Fehérje neve	Azonosító #	p érték	Változás ^a	Mt	Szekvencia lefedettség	Lokalizáció	Funkció
Szinaptikus átvitel								
ACTR1A	ARP1 aktin-kapcsolatos protein 1 homológ A, centraktin alfa (élesztő)	P85970, Q9CVB6	0,0021	1,48	42957	26,3	Citoplazma	Szinaptoszóma mintázás, növekedési kúp fejlődés
ATP6V1E	ATPáz, H ⁺ transzportáló, lizoszomális 31 kDa, V1 alegység E1	P50518, Q6PCU2	0,045	– 1,05	31729	35,6	Citoplazma, mitokondrium	Szinaptikus vezikulum proton gradiens generálás
GDI2	GDP disszociáció inhibitor 2	P50399	0,01	1,06	50521	34,6	Citoszkeletális, Golgi apparátus	Membrán-forgalom szabályozás
LIN7A	lin-7 homológ A (<i>C. elegans</i>)	Q8JZS0, Q9Z250	0,04	1,26	25845	29,7	Membrán, szinaptoszóma	Szinaptikus vezikulum transzport
POSZT-95	Posztzinaptikus denzitás fehérje-95	Q62108	0,0004	1,18	80456	14,1	Citoplazma, plazma membrán	Szinaptikus jelátvitel, neurogenesis, tanulás
SYN2	Szinapszin II	Q64332	3,80 E-06	4,04	63355		Plazma membrán, szinaptoszóma	Szinaptikus vezikulum membrán
Szénhidrát metabolizmus								
ENO1	Enoláz 1, (alfa)	P17182	0,046	1,05	47124	48,4	Citoplazma, sejtmag, plazma membrán	Glikolízis
G6PD	Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz	Q00612	0,011	1,06	59245	49,5	Citoplazma, Endoplazmás retikulum, sejtmag	Glükóz metabolizmus
LDHB	Laktát dehidrogenáz B	P16125	0,0063	– 1,12	36595	34,7	Citoplazma	Anaerob glikolízis
MDH1	Malát dehidrogenáz 1, NAD (oldékony)	O88989, P14152	0,016	– 1,1	36466	19,2	Citoszkeletális	Szénhidrát metabolizmus
NDUFS1	NADH dehidrogenáz (ubiquinone) Fe-S protein 1	Q91VD9	0,012	1,17	79731	18,8	Citoszkeletális	Elektron transzport
PDHA1	Piruvát dehidrogenáz (lipoamid) alfa 1	P26284, P35486	0,0021	1,48	43209	23,6	Extracelluláris tér, mitokondrium	Extracelluláris tér, mitokondrium

Gén neve	Fehérje neve	Azonosító #	p érték	Változás ^a	Mt	Szekvencia lefedettség	Lokalizáció	Funkció
PDHX	Piruvát dehidrogenáz komplex, komponens X	Q8BKZ9	0,015	1,21	49182	27,4	Mitokondrium	Glikolízis
PGAM1	Foszfoglicerát mutáz 1 (brain)	P25113, Q9DBJ1	0,041	1,12	28814	72,8	Citoplazma	Szénhidrát metabolizmus
PKM2	Piruvát kináz, izom	P52480	0,0019	2,47	57827	40,3	Citoplazma, mitokondrium	Glikolízis
SDHA	Szukcinát dehidrogenáz komplex, alegység A, flavoprotein (Fp)	Q8K2B3	0,01	1,16	72567	30,6	Mitokondrium, membrán	Szénhidrát metabolizmus
TKT	Transzketoláz (Wernicke – Korsakoff szindróma)	P40142	0,018	1,07	72567	14,1	Endoplazmás retikulum, peroxisome	Növekedés szabályozása
UQCRC1	Ubiquinol-citokróm c reduktáz core protein I	Q9CZ13	0,0087	1,09	52750	38,3	Mitokondrium	Mitokondriális elektron transzport
Aminosav metabolizmus								
ALDH6A1	Aldehid dehidrogenáz 6 család, tag A1	Q9EQ20	0,0059	1,08	57898	45,4	Mitokondrium	Aminosav metabolizmus
GLO1	Glioxaláz I	Q9CPU0	0,0045	1,41	20793	48,9	Citoplazma	Metabolizmus, detoxification of methylglyoxal
GLUD1	Glutamát dehidrogenáz 1	P26443	0,0091	1,05	61320	51,3	Mitokondrium	Glutamát metabolizmus
GLUL	Glutamát-ammónia ligáz (glutamine szintetáz)	P15105	2,5E– 05	– 1,24	42102	38,1	Citoplazma, mitokondrium	Glutamin metabolizmus
GOT2	Glutaminsav –oxálecetsav transzamináz 2	P05202	0,00049	– 1,48	47394	14,9	Mitokondrium	Glutamát metabolizmus
WARS	Triptofanil-tRNA szintetáz	P32921	0,0094	1,05	54341	53	Citoplazma	Fehérje transzláció
YARS	Tirozil-tRNA szintetáz	Q91WQ3	0,016	1,09	59088	50	Citoplazma	Fehérje transzláció
Proteolízis								
ddx56	CNDP dipeptidáz 2 (metallopeptidáz M20 család)	Q9D1A2	0,0039	-1,12	52750	51,8	Citoszkeletális	Karnozin és egyéb dipeptid hidrolízis

Gén neve	Fehérje neve	Azonosító #	p érték	Változás ^a	Mt	Szekvencia lefedettség	Lokalizáció	Funkció
LONP1	lon peptidáz 1, mitokondriális	Q8CGK3	0,0063	-1,12	36595	34,7	Mitokondrium	Fehérje metabolizmus
NLN	Neurolizin (metallopeptidáz M3 család)	Q91YP2	0,0016	1,19	80413	6,25	Citoplazma, mitokondrium	Proteolízis and peptidolízis
NSF	N-etilmaleimid-szenzitív faktor	P46460	0,02	1,12	82599	16,5	Citoplazma	Protein transzport, proteolízis és peptidolízis
PSMA6	Proteaszóma (prosome, macropain) alegység, alfa tip., 6	Q9QUM9	0,014	1,14	27354	38,6	Citoszkeletális, sejtmag	Ubiquitin -függő protein catabolism
Nukleotid metabolizmus								
ATIC	5-Aminoimidazol-4-karboxi ribonukleo-tide formiltranszferáz/ IMP ciklohidroláz	Q9CWJ9	0,01	-1,06	64200	19,3	Citoplazma, mitokondrium	Purine bioszintézis
CMPK1	Citidin monofoszfát (UMP-CMP) kináz 1, citoszólikus	Q9DBP5	0,026	-1,23	22148	42,9	Citoplazma, sejtmag, extracelluláris-sejtular tér from	UDP/CDP formation UMP/CMP
HMGB1	“High mobility group protein 1”-hez hasonló (HMG-1)	P63158	0,000027	-9,07	21877	33,5	Sejtmag	Nukleotid metabolizmus
MTHFD1	Metiléntetrahydrofolát dehidrogenáz(NADP+ függő) 1	Q922D8	0,035	1,08	101240	27,6	Mitokondrium	Egy szén metabolizmus
Hem és lipid metabolizmus								
BLVRA	Biliverdin reduktáz A	Q9CY64	1,7E-05	1,95	33507	41,7	Citoplazma	Stressz válasz, hem metabolizmus
ECHS1	Enoil koenzim A hidratáz, rövid lánc, 1, mitokondriális	Q8BH95	0,035	1,13	31457	37,9	Mitokondrium	Zsírsav oxidáció
IDH1	Izocitrát dehidrogenáz 1 (NADP+), oldékony	O88844	7,00E-06	2,60	46644	50,2	Citoszkeletális, mitokondrium	Lipid metabolizmus
OXCT1	3-Oxosav CoA transzferáz 1	Q9D0K2	0,00018	1,24	55972	24	Extracelluláris tér, mitokondrium	Lipid metabolizmus
PITPNA	Foszfatidilinozitol transzfer protein, alfa	P16466, P53810 P53810	0,037	-1,14	31889	53,1	Citoplazma	Vizuális felfogás, lipid

Gén neve	Fehérje neve	Azonosító #	p érték	Változás ^a	Mt	Szekvencia lefedettség	Lokalizáció	Funkció
SPR	Szepiapterin reduktáz	Q64105	0,00063	-1,24	27866	51	Citoplazma	Tetrahydrobiopterin szintézis
Fehérje bioszintézis és folding								
CAPZA1	Capping protein (aktin filament) izom Z-vonal, alfa 1	P47753	0,033	-1,35	32922	16,8	Citoplazma	Chaperon protein folding
CAPZA2	Capping protein (aktin filament) izom Z-vonal, alfa 2	P47754, Q3T1K5	0,0061	-1,08	32949	59,8	Citoplazma	Chaperon protein folding
CCT6A	Eukariota transzláció inicializáló faktor 4E	P80317	0,0028	-1,1	57987	19,4	Citoplazma	Transzláció inicializálás
EIF4E	Eukarióta transzláció inicializáló faktor 4E	P63073, P63074	1,20E-09	-11,42	25035	27,6	Citoplazma	Transzláció inicializálás
ERP29	Endoplazmás retikulum protein 29	P57759	1,20E-09	-11,42	28807	39,3	Endoplazmás retikulum	Protein folding
HSPA5	70 kDa Hősokk fehérje 5 (glükóz-regulált protein, 78 kDa)	P06761	0,032	1,12	72330	23,9	Citoplazma	Stressz válasz, protein folding
Citoszkeleton fehérjék								
CAP1	CAP, adenilát cikláz asszociált protein 1 (élesztő)	P40124	0,032	1,12	72330	23,9	Citoplazma, plazma membrán	Jelátvitel, Citoszkeletonszerveződés
CNP	2',3'-Ciklikus nukleotid 3'foszfodieszteráz	P16330	0,03	-1,47	47107	23,8	Citoplazma, plazma membrán	Mikrotubulus kötés
EZR	Ezrin	P26040	0,00057	1,15	69391	28,3	Citoplazma, citoszkeletális	Aktin szabályozás, Citoszkeletális
LMNA	Lamin A/C	P48678	0,00029	-1,71	74221	19,5	Sejtmag	Sejtmag lamina kialakulása
SEPT4	Szeptin 4	P28661	0,042	1,08	54918	23	Citoplazma, mitokondrium, sejtmag	Citoszkeletális szerveződés, membrán szerveződés vezikulum transzport
SEPT8	Szeptin 8	Q8CHH9	0,042	1,08	49794	25,9	Szeptin komplex	Citoszkeletális szerveződés, membrán szerveződés vezikulum transzport

Gén neve	Fehérje neve	Azonosító #	p érték	Változás ^a	Mt	Szekvencia lefedettség	Lokalizáció	Funkció
Agyi fejlődés és neurogenesis								
DPYSL2	Dihidropirimidináz-szerű 2	O08553	0,01	1,23	62260	22,2	Citoplazma. mitokondrium	Neuron fejlődés
DPYSL3	Dihidropirimidináz-szerű 3	Q62188	0,026	-1,12	61919	28,8	Citoplazma	Axon növekedés irányítása
PAK2	p21 (CDKN1A)-aktivált kináz 2	P52480	0,00061	-1,14	57827	28,2	Citoplazma. membrán. sejtmag	Jelátvitel, neurit növekedés
Oxidatív stressz								
GLRX3	Glutaredoxin 3	Q9CQM9	0,01	1,1	37760	56,7	Citoplazma	Redox homeosztázis
GSTM1	Glutation S-transzferáz M1	P10649	0,01	-1,18	25954	61,5	Plazma membrán	Oxidatív stressz, sejtpusztulás gátlása
PRDX6	Peroxiredoxin 6	O08709	0,0001	3,76	24854	77,2	Endoplazmás retikulum	Oxidatív stressz
QDPR	Quinoid dihidropteridine reduktáz	Q8BVI4	3,60E-06	1,86	25552	35,3	Citoplazma	Metabolizmus, redox homeosztázis
SIRT2	Szirtuin 2	Q8VDQ8	0,02	-1,22	43239	45,5	Citoplazma. sejtmag	Transzkripció szabályozás, DNS-függő redox homeosztázis
Jelátvitel								
MAP2K6	Mitogen aktivált protein kináz 6	P70236	0,023	-1,13	37412	37,1	Citoplazma	Jelátvitel
PPP1CA	Protein foszfatáz 1, katalitikus alegység. alfa izoforma	P62137	0,0064	-1,19	37524	27,3	Sejtmag. citoplazma	Metabolizmus, citokinezis, szignalizáció
PPP2R2A	Protein foszfatáz 2 (korábban 2A), szabályzó alegység B. alfa izoforma	P36876	0,039	-1,05	51661	17,4	Citoplazma	Szignalizáció
TARDBP	TAR DNA kötő protein	Q921F2	7,00E-05	-1,37	44529	27,3	Sejtmag	Transzkripció szabályozás
YWHAH	Tirozin 3-monooxygenáz/ triptofán 5-monooxygenáz aktiváló protein	P68510, P68511	0,026	-1,22	28194	34,6	Citoplazma	Szignalizáció

Gén neve	Fehérje neve	Azonosító #	p érték	Változás ^a	Mt	Szekvencia lefedettség	Lokalizáció	Funkció
Vegyes								
ALDH2	Aldehid dehidrogenáz 2 család (mitokondriális)	P47738	0,037	−1,14	31889	53,1	Mitokondrium	Alkohol metabolizmus
CA2	Szénsav anhidrázII	P00920	0,0063	1,17	29015	49,6	Citoplazma. plazma membrán	One carbon metabolizmus
DDX3X	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) doboz polipeptid 3, X-kapcsolt	Q62167	0,00054	1,22	73085	38,8	Citoplazma. sejtmag	RNA helikáz. translation initiation. splicing
DNM1	Dinamin 1	P21575	0,0062	−1,76	97280	21,6	Citoplazma. Citoszkeleton	Endocitózis
DNM1L	Dinamin 1-szerű	O35303, Q8K1M6	0,026	−1,2	83892	25,6	Citoplazma. mitokondrium	Mitokondriális morfológia szabályozása
HGS	Hepatocita növekedési faktor-regulált tirozin kináz szubsztrát	Q99LI8	0,0001	3,76	24854	77,2	Citoplazma. sejtmag	Jelátvitel, endocitózis
HNRNPH1	Heterogén sejtmag ribonukleoprotein H1 (H)	O35737	0,015	1,21	49182	27,4	Sejtmag	RNA feldolgozás
HNRPDL	Heterogén mag ribonukleoprotein HID-szerű	Q3SWU3	0,041	−1,1	35227	31,1	Citoplazma. sejtmag	RNA metabolizmus
IMMT	Belső membrán protein, mitokondriális (mitofilin)	Q8CAQ8	0,049	−1,06	83883	34,9	Mitokondrium	Mitokondriális belső membrán morfogenezis
NSFL1C	NSFL1 (p97) kofaktor (p47)	O35987,	1,90E−05	−1,75	40662	31,9	Sejtmag	Membrán fúzió
PCBP1	Poli(rC) kötő protein 1	P60335	0,048	1,2	37480	19,4	Citoplazma. sejtmag	mRNA metabolizmus
PCMT1	Protein-L-izoaszpartát (HID-aszpartát) O-metiltranszferáz	P22062, P23506	0,00055	1,32	24624	47,6	Citoplazma	Fehérje módosítás
PRPF19	PRP19/PSO4 pre-mRNA feldolgozás faktor 19 homológ (S. cerevisiae)	Q99KP6	0,035	−1,1	55221	13,1	Citoplazma. sejtmag	DNA javítás
SCRN1	Szecernin 1	Q9CZC8	0,026	1,12	46308	51,9	Citoplazma.	Exocitózis
VDAC2	Feszültség-függő anion csatorna 2	P81155, Q60930	0,045	−1,05	31729	35,6	Mitokondrium	Apoptózis szabályozása

^a Változás: pozitív → növekedés, negatív → csökkenés, a változás nagyságát jelöli (hányszoros)

8. táblázat

Fibrilláris β -amiloid 1-42-vel koprecipitált fehérjék azonosítása LC-MS/MS módszerrel

Fehérje neve	Azonosító #	Peptidek száma	Pontszám
Szinapszin-1	P09951	73	2522
Vakuólum ATP szintáz alegység B, agyi izoforma	P62815	46	1446
Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz, GAPDH	P04797	34	1351
Bassoon protein	O88778	41	1030
Szinapszin-2	Q63537	22	873
Tubulin β-lánc	P04691	25	825
Mielin bázikus protein S	P02688	32	769
Vakuólum proton transzlokáló ATPáz 116-kDa alegység a izoforma 1	P25286	31	750
p130Cas-asszociált protein	Q9QXY2	12	442
Tubulin α -1 lánc	P02551	16	433
2',3'-Ciklikus nukleotid 3'-foszfodieszteráz	P13233	12	396
β -Amiloid A4 protein prekursor	P08592	5	279
γ -Enoláz	P07323	3	237
Nátrium/kálium-transzportáló ATPáz α -3 lánc	P06687	7	226
Elongációs faktor 1- α 1	P62630	7	215
Agyi savoldható protein 1	Q05175	3	201
Dihidropiridin-szenzitív 1-típ., kalcium csatorna α -2/ δ alegység prekursor	P54290	6	164
Szinapszin-3	O70441	5	157
Flotillin-1	Q9Z1E1	7	156
Szeptin 7	Q9WVC0	7	139
Neurotrimin prekursor	Q62718	3	128
Vezikulum-asszociált membrán protein 2	P63045	2	127
Kofilin, Nem-izom izoforma	P45592	3	122
Szukcinil-CoA ligáz [GDP-képző] α -lánc, mitokondriális prekursor	P13086	5	118
ATP szintáz α lánc, mitokondriális prekursor	P15999	5	117
Piccolo protein	Q9JKS6	9	117
Mikrotubulus-asszociált protein 2	P15146	3	117

Fehérje neve	Azonosító #	Peptidek száma	Pontszám
Reguláló szinaptikus membrán exocitózis protein 1	Q9JIR4	2	89
Ras GTPáz-aktiváló protein SynGAP	Q9QUH6	3	88
ATP szintáz e lánc, mitokondriális	P29419	2	88
Opioid-kötő protein/sejt adhéziós molekula prekursor	P32736	5	87
Citokróm c oxidáz alegység IV izoforma 1, mitokondriális prekursor	P10888	3	69
Ras-kapcsolatos C3 botulinum toxin szubsztrát 1	Q6RUV5	4	68
Kontaktin-asszociált protein 1 prekursor	P97846	3	67
Rabphilin-3A	P47709	8	66
Gap junction α -1 protein	P08050	3	61
Kontaktin 2 prekursor	P22063	3	59
Process density protein 95	P31016	4	52
ELKS-Rab6-interacting protein-Citomatrix at the aktiváló zone asszociált strukturális protein 2	Q8K3M6	3	48
Kalcium/kalmodulin-függő protein kináz tip. II a lánc	P11275	3	44

* A **vastagított betűvel** jelzett fehérjéket 1D-PAGE-MALDI-TOF MS módszerrel is azonosítottuk

9. táblázat

Oligomer A β 1-42 kezelés hatására megváltozott expressziójú fehérjék SH-SY5Y neuroblasztóma sejtenyészetben.

Fehérje neve	Azonosító # ^a	pI ^b	Mt (kDa) ^b	Peptidek száma ^c	Lefedettség ^d	Változás ^e	p-érték ^f	Funkció
Elongációs faktor 2	P13639	6,42	95,18	19 (19)	25,90%	-3,6	0,00787	Fehérje bioszintézis
Heterogén mag ribonukleoprotein K	P61978	5,39	50,96	16 (27)	40,60%	-2,5	0,00416	mRNA feldolgozás
Elongációs faktor 2	P13639	6,42	95,18	4 (7)	5,13%	-2,4	0,00987	Fehérje bioszintézis
Elongációs faktor 2	P13639	6,42	95,18	2 (2)	2,68%	-2,3	0,00261	Fehérje bioszintézis
Glutaminil-tRNA szintetáz	P47897	6,74	87,67	12 (21)	17,80%	-2,1	0,00705	Fehérje bioszintézis
ATP-függő RNA helikáz DDX3X	O00571	6,73	73,11	13 (15)	22,20%	-2,1	0,0121	mRNA feldolgozás
Fehérje transzport protein Sec23B	Q15437	6,23	83,44	9 (13)	19,00%	-2	0,00806	Intracelluláris fehérje transzport (ER hid Golgi vezikulum mediált transzport)
Propionil-CoA karboxiláz alfa lánc, mitokondriális	P05165	6,16	74,25	12 (28)	23,30%	-2	0,00355	Metabolikus feldolgozás (lipid metabolizmus)
Asparaginil-tRNA szintetáz, citoplazma	O43776	5,91	62,81	11 (21)	24,10%	-1,9	0,00485	Fehérje bioszintézis
Citoszólikus nem-specifikus dipeptidáz	Q96KP4	5,66	52,75	17 (27)	49,90%	-1,9	0,00595	Proteolízis
6-Foszfoglükonát dehidrogenáz, dekarboxiláló	P52209	6,88	53,01	9 (20)	25,10%	-1,9	0,0118	Metabolikus feldolgozás (pentóz metabolizmus)
Dihidropirimidináz-kapcsolatos protein 2	Q16555	5,95	62,29	4 (4)	9,97%	-1,8	0,00373	Citoszkeletális szerveződés (idegsejt növekedés)
Treonil-tRNA szintetáz, citoplazma	P26639	6,23	83,44	8 (16)	12,60%	-1,7	0,0181	Fehérje bioszintézis
Adenil cikláz-asszociált protein 1	Q01518	7,31	51,43	12 (22)	24,00%	-1,7	0,00283	Citoszkeleton szerveződés (cAMP útvonál)
1,2-dihidroxi-3-keto-5-metilpantóten dioxigenáz	Q9BV57	5,44	21,37	6 (12)	37,40%	-1,7	0,00247	Metabolikus folyamat (metionin bioszintetikus feldolgozás)
Far upstream element-kötő fehérje 2	Q92945	6,85	73,12	17 (17)	29,60%	-1,6	0,0189	Transzkripció szabályozása
Foszfoglükomutáz-2	Q96G03	6,29	68,15	10 (23)	19,10%	-1,6	0,00604	Metabolikus folyamat (glükóz metabolizmus)
Dihidropirimidináz-kapcsolatos protein 3	Q14195	6,04	61,96	18 (20)	48,10%	-1,6	0,00187	Citoszkeletális szerveződés

Fehérje neve	Azonosító # ^a	pI ^b	Mt (kDa) ^b	Peptidek száma ^c	Lefedettség ^d	Változás ^e	p-érték ^f	Funkció
Piruvát dehidrogenáz E1 komponens alegység Béta, mitokondriális	P11177	5,38	35,90	9 (21)	34,80%	-1,6	0,0158	Metabolikus feldolgozás (piruvát metabolizmus)
Profilin-1	P07737	8,47	14,92	9 (9)	63,60%	-1,6	0,000915	Citoszkeletális szerveződés
Tirozil-tRNA szintetáz, citoplazma	P54577	6,64	59,01	15 (23)	33,50%	-1,5	0,0179	Fehérje bioszintézis
Poli(rC)-kötő fehérje 2	Q15366	6,33	38,22	8 (15)	23,00%	-1,5	0,016	mRNA feldolgozás
Foszfatidilinozitol transzfer protein Béta izoforma	P48739	6,44	31,41	10 (10)	41,70%	-1,5	0,00622	Jelátvitel (foszfatidilinozitol jelátviteli út vonal)
Inozin trifoszfát pirofoszfátáz	Q9BY32	5,51	21,31	4 (4)	33,00%	-1,5	0,0097	Metabolikus feldolgozás (nukleotid metabolizmus)
Hősokk 70 kDa fehérje 6	P17066	5,81	71,03	10 (17)	26,60%	3,5	0,000229	Stressz válasz
Hipoxia up-regulált fehérje 1	Q9Y4L1	5,07	107,66	29 (29)	39,30%	2,5	0,00417	Stressz válasz
Heterogén sejtmag ribonukleoprotein K	P61978	5,39	50,96	11 (20)	24,80%	2,1	0,00734	mRNA feldolgozás
Hősokk fehérje 1	P08107	5,48	69,92	23 (25)	43,50%	2	0,00574	Stressz válasz
Katepszin HID	P07339	5,6	37,85	12 (16)	38,10%	2	0,00839	Proteolízis
Ubiquitin karboxi-terminális hidroláz 5	P45974	4,91	95,66	19 (27)	29,30%	2	0,0105	Proteolízis (ubiquitin-függő protein katabolizmus)
Hipoxia up-regulált fehérje 1	Q9Y4L1	5,07	107,66	22 (26)	28,00%	1,8	0,0168	Stressz válasz
Matrin-3	P43243	5,87	94,49	11 (14)	15,80%	1,8	0,0165	Transzkripció szabályozása
Endoplazmás retikulum rezidens protein ERp44	Q9BS26	5,04	43,72	6 (14)	22,90%	1,8	0,00484	Stressz válasz
Matrin-3	P43243	5,87	94,49	8 (10)	11,70%	1,7	0,00277	Transzkripció szabályozása
Kalretikulin	P27797	4,29	46,47	7 (10)	20,60%	1,7	0,0018	Stressz válasz
ATP szintáz alegység hid, mitokondriális	O75947	5,22	18,36	12 (14)	65,20%	1,7	0,000718	Mitokondriális funkció

Fehérje neve	Azonosító # ^a	pI ^b	Mt (kDa) ^b	Peptidek száma ^c	Lefedettség ^d (%)	Változás ^e	p-érték ^e	Funkció
Glutation S-transzferáz kappa 1	Q9Y2Q3	8,53	25,37	9 (19)	46,90%	1,7	0,0118	Stressz válasz (sejt redox homeosztázis)
Lamin-B1	P20700	5,11	65,96	31 (31)	46,40%	1,6	0,0169	Sejtmag fehérje (sejtmaghártya szerveződés)
Fumarát hidratáz, mitokondriális	P07954	6,99	50,08	13 (19)	30,60%	1,6	0,0126	Metabolikus feldolgozás (citromsav - ciklus)
Lamin-A/C	P02545	6,44	72,22	17 (21)	28,90%	1,5	0,00928	Sejtmag fehérje (sejtmaghártya szerveződés)
Lizoszomális Pro-X karboxipeptidáz	P42785	6,21	51,04	8 (29)	15,10%	1,5	0,00943	Proteolízis
78 kDa glükóz-regulált protein	P11021	5,01	70,47	16 (23)	26,60%	1,5	0,00685	Stressz válasz
SUMO-aktiváló enzim alegység 1	Q9UBE0	5,17	38,45	11 (18)	38,70%	1,5	0,0000279	Fehérje poszt-transzlációs módosítás (protein sumoilezés)
Heterogén mag ribonukleoprotein HID-szerű	O14979	9,59	46,44	10 (22)	17,40%	1,5	0,00189	mRNA feldolgozás
Tirozin-1A	O14656	6,17	35,78	11 (20)	38,90%	1,5	0,00387	Protein folding (molekuláris chaperon)
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoil-CoA isomeráz, mitokondriális	Q13011	5,99	32,21	12 (14)	46,00%	1,5	0,00236	Metabolikus feldolgozás (zsírsav metabolizmus)
Endoplazmás retikulum protein ERp29	P30040	6,08	25,85	11 (26)	37,90%	1,5	0,0183	Stressz válasz
Béta-hexóزامинидáz alegység Béta	P07686	6,27	21,63	10 (19)	16,70%	1,5	0,000467	Lizoszomális protein
Peroxiredoxin-4	Q13162	5,54	26,57	9 (14)	49,80%	1,5	0,00482	Stressz válasz (oxidatív stressz)
Katepszin B	P07858	4,95	27,81	5 (13)	15,30%	1,5	0,00886	Proteolízis
Citrát szintáz, mitokondriális	O75390	7,39	49,01	15 (27)	30,70%	1,5	0,00591	Metabolikus folyamat (citromsav ciklus)

^a Swiss-Prot/TrEMBLE azonosítási szám

^b Az érett, leghosszabb fehérje számított molekulatömege (Mt) és izoelektromos pontja (pI)

^c A fehérjeazonosításhoz használt peptidek száma

^d Peptidek által lefedett fehérjeszekvencia

^e Változás: pozitív → növekedés, negatív → csökkenés, a változás nagyságát jelöli (hányszoros)

^f Student-t teszt szignifikanciaszintje (csak $p \leq 0.05$ eredményeket tekintettük szignifikánsnak)

10. táblázat

Fehérjeváltozások az NBM-SI-ben A β vagy E2-A β kezelés hatására

Folt	Fehérje neve	Azonosító #	E0-ACSF vs.E0-A β p érték ^a	arány ^b	E0-A β vs.E2-A β p érték	arány	Molekula tömeg	pI	Szekvencia lefedettség %
Antioxidáns védelem									
SI0210	belső membrán fehérje, mitokondriális	70608131	0,3	-1,12	0,044	1,19	86295,4	7,02	5
SI0482	protein diszulfid izomeráz asszociált 3	112293264	0,042	1,1	0,03	-1,11	56678,7	5,88	5
SI1474	N(G),N(G)-dimetilarginin dimetilamin	45476968	0,048	1,07	0,037	-1,07	29646	5,66	6
SI1633	DJ-1 protein	74212240	0,001	-1,07	0,039	1,12	20025,4	6,32	12
SI1669	glutation S-transzferáz, alfa 4	160298217	0,37	-1,14	0,016	1,31	26890,5	6,02	13
Citoszkeleton									
SI0254	dihidropirimidináz-szerű 2	40254595	0,03	1,44	0,12	-1,27	62277,9	5,95	13
SI0256	dihidropirimidináz-szerű 2	40254595	0,038	1,4	0,23	-1,24	62277,9	5,95	29
SI0381	dihidropirimidináz-szerű 2	40254595	0,049	-1,12	0,44	-1,05	62277,9	5,95	5
SI0633	fascin	497775	0,021	1,28	0,041	-1,33	54508,3	6,44	5
SI0886	gamma-aktin	74191566	0,036	-1,18	0,028	1,17	41811,1	5,29	15
Metabolizmus									
SI0212	NADH-ubiquinon oxidoreductáz 75-kDa alegység, mitokondriális	47117271	0,017	1,29	0,67	-1,04	79777,3	5,51	4
SI0433	kreatine kináz, agy	74223625	0,016	-1,88	0,54	-1,07	42753,5	5,46	4
SI0625	aldehide dehidrogenáz család 5, alcsalád A1	27369748	0,0082	1,17	0,37	-1,14	55968,5	8,53	4
SI0660	aldehid dehidrogenáz család 7, tag A1	188219757	0,82	-1,06	0,044	1,13	58861,8	7,16	10
SI0665	enoláz 2, gamma neuronális	70794816	0,025	1,12	0,002	-1,13	47141,1	6,37	7
SI0685	ATP szintáz, H ⁺ transzporter, mitokondriális F1 komplex, alfa alegység, izoforma 1	74211977	0,037	-1,42	0,85	1,03	59782,9	9,22	5
SI0817	szukcinát-koenzim A ligáz, Béta alegység	74151797	0,05	1,18	0,45	-1,05	50797	7,7	11
SI1191	laktát dehidrogenáz B	6678674	0,0092	1,1	0,11	-1,04	36572,5	5,7	5
SI1194	laktát dehidrogenáz B	6678674	0,048	1,12	0,13	-1,06	36572,5	5,7	23
SI1310	malát dehidrogenáz 1, NAD (soluble)	254540027	0,19	1,07	0,036	-1,07	40059,5	7,07	7
SI1414	tirozin 3-monooxygenáz/ triptofán 5-monooxygenáz aktiváló	26344914	0,0016	-1,34	0,4	1,07	28212	4,81	30
SI1503	Foszfoglicerát mutáz 1	114326546	0,12	1,07	0,029	-1,11	28832,1	6,68	32

Folt	Fehérje neve	Azonosító #	E0-ACSF vs.E0-Aβ		E0-Aβ vs.E2-Aβ		Molekula tömeg	pI	Szekvenca lefedettség %
			p érték ^a	arány ^b	p érték	arány			
SI1643	Savhalogenid dehalogenáz-szerű hidroláz domén 2	74190684	0,79	1,01	0,046	−1,2	28760,4	5,69	12
Fehérje turnover és stabilitás									
SI0169	Hősokk fehérje 1, alfa	74147335	0,037	−1,08	0,28	−1,04	84816,3	4,93	10
SI0720	proteaszoma (prosome, macropain) 26S alegység, ATPáz 2	33859604	0,0011	−1,45	0,03	1,38	52866,9	5,97	8
SI0515	Hősokk fehérje 1 (chaperonin)	148680184	0,042	1,13	0,47	−1,04	53095,7	5,3	12
SI1350	otubain 1	19527388	0,043	−1,19	0,85	1,02	31270,2	4,85	16
Jelátvitel									
SI0676	guanozin difoszfát (GDP) dissociáció inhibitor 1	74150721	0,18	1,1	0,0062	−1,13	57736,9	8,17	7
SI1313	protein foszfatáz 2A, szabályzó alegység B (PR 53), izoforma CRA_b	26327445	0,024	1,1	0,0067	−1,11	38513,4	6,14	7
SI1467	inozitol (mio)-1(or 4)-monofoszfátáz 1, izoforma CRA_b	148673218	0,0066	1,13	0,27	1,06	31025,9	4,79	4
SI1538	kalbindin 2	34098931	0,036	−1,3	0,34	1,09	31372,8	4,94	11
SI1548	kalbindin 2	34098931	0,0057	−1,17	0,96	1,01	31372,8	4,94	18
SI1553	kalbindin-28K, izoform CRA_a	6753242	0,013	1,34	0,54	−1,06	30093,4	4,71	24
SI0564	protein foszfatáz 3, katalitikus alegység, alfa izoforma, izoforma CRA_hid	148680184	0,038	−1,36	0,11	1,22	62277,9	5,95	6
Szinaptikus feldolgozás									
SI0122	Aldh1l1 protein	27532959	0,035	1,14	0,37	−1,07	98734,7	5,69	2
SI0500	Foszfátidil-etanolamin kötő protein 1	74222953	0,049	1,18	0,28	−1,11	20889,6	5,36	14
SI0572	glutamát dehidrogenáz 1 prekursor	6680027	0,58	−1,07	0,0028	1,18	61337,1	8,05	10
SI1307	Foszfátidil-etanolamin kötő protein 1	74222953	0,031	1,16	0,13	−1,08	20889,6	5,36	25
SI1711	Foszfátidil-etanolamin kötő protein 1	74222953	0,71	1	0,0049	1,03	20889,6	5,36	51
Ismeretlen									
SI1571	mCG9061	148706375	0,049	1,14	0,31	−1,07	28401,8	8,17	21
SI1716	RIKEN cDNA 1110067D22	148675893	0,027	1,14	0,3	1,05	19556,5	5,48	6

^a Student-t teszt szignifikanciaszintje (csak $p \leq 0.05$ eredményeket tekintettük szignifikánsnak).

^b arány: pozitív → növekedés, negatív → csökkenés, a változás nagyságát jelöli (hányszoros)