

XXXII. OTDK BIOLÓGIA SZEKCIÓ

Szekvenciális fehérjeextrakció optimalizálása bőrbetegségek proteomikai vizsgálatához

Bozó Renáta

Biológus MSc II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar



SZTE-ÁOK Szent-Györgyi AlbertKlinikai Központ Bőrgyógyászati és
AllergológiaiKlinika

Témavezető: Dr. Groma Gergely tudományos munkatárs, Prof. Dr. Kemény
Lajos egyetemi tanár

Belső konzulens: Dr. Bodai László egyetemi docens
SZTE-TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

2015.

TARTALOMJEGYZÉK

I.	Rövidítések jegyzéke:	4
II.	Bevezetés	5
1.	A bőr szerkezete és funkciói	5
2.	Az extracelluláris mátrix	5
2.1.	Az extracelluláris mátrixfelépítése.....	5
2.2.	Az extracelluláris mátrix funkciói.....	5
2.3.	Az extracelluláris mátrix szerepe betegségekben	6
2.4.	Az extracelluláris mátrix szerepe bőrbetegségekben	6
2.5.	Az extracelluláris mátrix szerepe psoriasisban	7
3.	Fehérjekivonási módszerek különböző szövetekből	8
3.1.	Extrakció szívből.....	8
3.2.	Extrakció egér porcszövetből.....	9
3.3.	Extrakció bőrből.....	9
4.	Korábbi proteomikai eredmények psoriasisban	9
III.	Célkitűzések	13
IV.	Anyag és módszer	14
1.	Anyagok	14
1.1.	Homogenizáláshoz használt anyagok	14
1.2.	Szekvenciális fehérjekivonáshoz használt anyagok.....	14
1.3.	Etanol precipitálás során használt anyagok.....	15
1.4.	Deglikoziláció során használt anyagok.....	15
1.5.	Pepszines emésztés során használt anyagok	16
1.6.	Fehérjekoncentráció meghatározás során használt anyagok.....	16
1.7.	Denaturáló poliakrilamid-gélelektroforézishez használt anyagok	16
1.8.	Berendezések, programok:	16
2.	Alkalmazott módszerek.....	18
I.	Kísérlet:	18
1.	Bőrminták homogenizálása, előkészítése	18
2.	Három lépéses fehérje extrakció	18
3.	Fehérjék precipitálása etanollal.....	18
4.	Fehérjekoncentráció meghatározása BCA-módszerrel.....	19
5.	Fehérjék szeparálása denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel (1D SDS-PAGE).....	19
6.	Fehérjék detektálása poliakrilamid gélen Coomassie kék festéssel.....	19

7. Fehérjék azonosítása nano-HPLC MS/MS technikával.....	19
II. optimalizálási kísérlet.....	20
1. Bőrminták homogenizálása, előkészítés	20
2. Négylépéses fehérjeextrakció	20
3. Fehérjék precipitálása etanollal.....	21
4. Fehérjék koncentrációjának meghatározása, szeparálása, detektálása és azonosítása 21	
III. optimalizálási kísérlet.....	21
1. Bőrminták darabolása, előkészítés	21
2. Négylépéses fehérje extrakció	22
3. Fehérjék precipitálása, koncentráció meghatározása, szeparálása, detektálása, azonosítása	22
4. Egyéb módszerek	22
1. Deglikozilálás.....	22
2. Emésztés pepszinnel.....	22
3. Fehérjekoncentráció meghatározása nanodrop technikával	22
V. Eredmények és értékelésük.....	24
1. Eredmények.....	24
I. kísérlet.....	24
II. optimalizálási kísérlet.....	26
27	
III. optimalizálási kísérlet.....	28
IV. További kísérletek.....	30
V. Eredmények értékelése.....	30
1. Optimális mintamennyiség meghatározása.....	30
2. Minta előkészítés optimalizálása	30
3. A három és négylépéses extrakció	31
VI. Összefoglalás.....	33

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:

BCA	bicinchoninicsav
BM	bazális membrán
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)dimetilammonio]-1-propánszulfonát
DMSO	dimetil-szulfoxid
DTT	ditiotritol
1D SDS-PAGE	egy dimenziós, nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid-gélelektroforézis
ECM	extracelluláris mátrix
EDTA	etilén-diamid-tetraecetsav
GnHCl	guanidin-hidroklorid
GSTP1	glutation-S-transzferáz-1
HPLC	nagy hatékonyságú folydékkromatográfia
IL-17	interleukin-17
LTQ	Linear Ion Trap
iTRAQ	izobár reagensekkel történő jelölés
LC-MS/MS	folyadék-kromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight
MgCl ₂	magnézium-klorid
MMP	mátrix-metalloproteináz
NaAc	nátrium-acetát
NaCl	nátrium-klorid
Na ₂ EDTA	dinátrium-etilén-diamid-tetraecetsav
Na-deoxikolát	nátrium-deoxilát
PBS	foszfát puffereelt sóoldat
PI	proteináz inhibitor
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PRDX2	peroxiredoxin-2
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
TEAB	triethylammónium-bikarbonát
TIMP	mátrix metalloproteinázok szöveti inhibitora

II. BEVEZETÉS

1. A BŐR SZERKEZETE ÉS FUNKCIÓI

A bőr az emberi szervezet legnagyobb szerve, felszíne 1,6-1,8 m², tömege átlagosan 3-3,5 kg. Biztosítja a szervezet mechanikai, fizikai, kémiai, mikrobiológiai és immunológiai védelmét, valamint hő- és vízháztartásának egyensúlyát. Három fő rétegét különböztetjük meg: epidermisz (hám), dermisz (irha), subcutis-hypodermis (bőralja).

Az epidermisz keratinocytákból felépülő, többrétegű elszarusodó laphám, amelyet a bazális membrán választ el a dermis kötőszövetes rétegétől. Az epidermis és a dermis együtt a cutis, amelynek keringését, táplálását, beidegzését a dermis biztosítja.

A dermist gazdag ér- és ideghálózat jellemzi, benne főként kollagén, elasztikus rostok, fibroblastok és histiocyták találhatóak. Két jól elkülönülő réteg alkotja: a papillaris és a reticularis dermis[1].

A subcutis lobulusokba rendezett zsírszövet a dermis és a fascia között. A lobulusokat fibrotikus septumok választják el egymástól, ebben futnak az erek és az idegek. Ezek az összefonódó fibrotikus kötegek a dermisből kiindulva komplex hálózatot formálnak, biztosítják a bőr rögzítését, rugalmasságát és mechanikai ellenálló képességét [2].

2. AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX

2.1. AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIXFELEPÍTÉSE

Az extracelluláris mátrix (ECM) olyan sejten kívüli molekulák összessége, amely strukturális és biokémiai támaszt biztosít [3]. Felépítésében proteoglikánok (heparán-szulfát, kondroitin-szulfát, keratán-szulfát), nem proteoglikán poliszacharidok (hialuronsav), kollagén, elasztin rostok és további fehérjék vesznek részt, (pl. fibronektin, laminin)[4]. Az ECM nem statikus szerkezetű, felépítését a folyamatos szintézis és lebomlás jellemzi, amelynek szabályozásában a mátrixmetalloproteináz (MMP) családnak kiemelkedő szerepe van[5].

2.2. AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX FUNKCIÓI

Az ECM a szöveti rezisztencia és rugalmasság biztosítása mellett, részt vesz az intercelluláris kommunikációban, a szövetek elhatárolásában és összekötésében, meghatározza a sejtek dinamikus viselkedését, számos növekedési faktort különít el és tárol [6]. Az ECM fehérjék és proteoglikánok alapvető szerepet játszanak a szövetek működésének és integritásának fenntartásában, sejt-mátrix, mátrix-mátrix, sejt-sejt interakciókon keresztül [5]. A sejtnövekedés szabályozása során különböző utakon keresztül kölcsönhatásra képesek növekedési faktorokkal

és egyéb extracelluláris molekulákkal[7]. További funkciói közé tartozik a sejtsors, a sejt differenciáció és –migráció [8] szabályozása, [9], a sejt-mátrix interakciók befolyásolják az apoptózis indukcióját [10], hatással vannak a sejtosztódásra, valamint részt vesznek annak pozícionálásában [11]. Az ECM szerepe nemcsak a szöveti homeosztázis fenntartásában fontos; elváltozásai kóros eltérések kialakulásához vezetnek több betegségben is [5]. Az ECM fehérjék erős térhálós szerkezetet alkotnak, emiatt nehezen oldhatók, továbbá gazdagok poszttranszlációs módosításokban (főként glikoziláció), amelyek módosítják a tömeget, a töltést, az elektroforetikus tulajdonságokat, és hatással vannak az elválasztásra és a tömegspektrometriás azonosításra [12].

2.3. AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX SZEREPE BETEGSÉGEKBEN

Az ECM esszenciális szerepét és jelentőségét jól mutatja, hogy elváltozásai az emberi test bármely szervét érinthetik. Az elváltozások lehetnek monogénesek (pl. osteogenesis imperfecta[13], Ehlers-Danlos szindróma [14], Marfan szindróma [15]), poligénesek (pl. coronaria betegségek [16], magas vérnyomás [17]), és egyéb betegségek (pl. asztma, krónikus obstruktív tüdőbetegség [18], májcirrhosis [19], gyulladásos bélbetegség, Crohn-betegség [20], glomerulosclerosis, tubulointestinalis fibrosis [21], rheumatoid arthritis, osteoarthritis [22], tumor metastasis [23] stb.).

2.4. AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX SZEREPE BŐRBETEGSÉGEKBEN

Az ECM funkcionális és szerkezeti változásai, komponenseinek eltérő aránya a gyakori bőrbetegségek esetén is megfigyelhetőek. Melanoma invázió és metastasis során például megfigyelték a bazális membrán degradációját és az ECM proteolitikus enzimek általi átrendeződését, amelyben kitüntetett szerepe van az MMP-knek és szöveti inhibitoraiknak (TIMP-ek). Az átrendeződés mértéke ezen fehérjék koncentrációjától függ [24]. Melanoma esetén az ECM-nek fontos szerepe van a tumor mikro környezetének kialakításában: a heparán-szulfát proteoglikánok fontos komponensei a melanoma tumor ECM-nek, expressziójuk korrelál a kulcsfontosságú melanocita funkciókkal [25]. A fibronektin és a vitronektin az ECM fehérjék fontos képviselői, amelyek magasabb szintjét figyelték meg melanoma esetén. A fehérjék nem mutattak prediktív és prognosztikai jelentőséget, viszont diagnosztikai markerek lehetnek melanomás betegek esetén [26].

Bizonyos bőrbetegségekből (pl. ekzema és psoriasis) kitüntetett szerepe van az ECM egyik fontos glükózaminoglikán molekulájának, a hialuronsavnak, amely részt vesz a celluláris migráció, differenciáció, proliferáció szabályozásának folyamataiban. Ekzemában epidermális hiperplasia vizsgálata során megállapították, hogy a hialuronsav szint a léziós bőrben

hialuronidáz hatására csökken, és gátolja az epidermális hiperplasia kialakulását, valamint a hialuronidáz jelentős résztvevője a sérülés hatására kialakuló válaszreakciónak [27].

Az atópiás dermatitisz gyulladásos bőrbetegség, melyben a lézióhoz az epidermális növekedésben és differenciációban szerepet játszó ECM molekulák is hozzájárulnak [28]. Megfigyelték, hogy az interleukin-17 (IL-17) a betegség során szerepet játszik a szövet helyreállítási és átrendeződési folyamataiban, szintje korrelál a remodelling markerek (MMP-9, prokollagén-3, tenascin C) és az IL-17+ T-sejtek jelenlétével a léziós bőrterületeken atópiás és kontakt dermatitisz esetén is [29].

2.5. AZ EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX SZEREPE PSORIASISBAN

A pikkelysömör a lakosság 1-3%-át érintő, krónikus gyulladásos, nem fertőző, immunmediált bőrbetegség, amelynek legjellemzőbb tünetei a vörös, hámló foltok, plakkok. A szövet- és sejtszintű eltérések mellett a betegséget széleskörű molekuláris elváltozások is jellemzik. Növekvő számú kutatási eredmény mutat az abnormális immunfolyamatok központi szerepére a betegség kialakulásában, ugyanakkor a sejten kívüli állományban bekövetkező elváltozások kevésbé ismertek. Psoriasis esetén már a tünetmentes bőrterületeken is bekövetkeznek eltérések.

A bazális membrán, laminin, és IV-es típusú kollagén strukturális elváltozásait megfigyelték a pikkelysömörös tünetes és tünetmentes bőrben is [30][31]. A fő sejtfelszíni laminin kötő receptor az $\alpha 6 \beta 1$ és az $\alpha 6 \beta 4$ integrin [32]. Az integrinek közvetítik a sejt-sejt és sejt-mátrix interakciókat, továbbá befolyásolják a sejtek túlélését, differenciálódását, a migrációt és az apoptózist [33][34].

A sejtproliferációban szerepet játszó fibronectin fő sejtfelszíni receptora, az $\alpha 5$ -integrin a psoriasisos epidermis keratinocytáin fokozott mértékben fejeződik ki a normál epidermiszhez képest [7], a fibronectin A doménje pedig jelen van a psoriasisos tünetmentes bőrben [35]. A fibronectin szolubilis dimerként szekretálódik, az integrinokkal kapcsolódva alakul ki a fibrilláris szerkezet, és ezek a filamentek kapcsolódnak különböző ECM komponensekhez (fibrin, fibulin-1, heparin, szindekán és kollagén) [36].

A kollagén az ECM fő strukturális komponense, sok egyéb fehérjével és proteoglikánnal hozzájárul az ECM szerkezetének kialakításához, létrehozva egy komplex, három dimenziós funkcionális hálózatot, amely hálózatban bekövetkező abnormalitásoknak potenciális szerepe van a psoriasis kialakulásában. Koivukangas és munkatársai megfigyelték, hogy emelkedett kollagén szint mellett a bőr vastagsága nem változik pikkelysömörös megbetegedés esetén [37]. A betegséggel korábban már összefüggésbe hozták a IV-es típusú kollagén diszfunkcióját is,

továbbá bizonyos MMP-k eltérő funkcióját és depozícióját. A IV-es típusú kollagén a bazális lamina kialakításában vesz részt, ezáltal fontos alkotója annak a szupramolekuláris hálózatnak, amely inter- és intramolekuláris interakciók révén valósul meg, és befolyásolja a sejtadhéziót, migrációt, és differenciációt [38].

Az MMP-k a cink-dependens endopeptidázok családjába tartozó enzimek, fontos szerepet töltenek be az extracelluláris mátrix degradációjában, átalakításában, különböző fejlődési stádiumokban a szövetek kialakításában, helyreállításában, az angiogenezisben[39], a sebgyógyulásban, az emlő, és a méh involúciójában, a tumornövekedésben és metastasisok kialakulásában [40]. A bőrben általában nem konstitutívan, hanem exogén jelek hatására expresszálódnak. Fibroblastok, keratinocyták, makrofágok, eozinofil granulocyták, hízósejtek, endothel sejtek termelik, aktivitásukat többek között a TIMP-ek szabályozzák[39]. Ismert, hogy a psoriasist gyulladásos reakció kíséri, és a különböző gyulladásos sejtek által számos MMP termelődik [41]. Az MMP-1 és MMP-9 a psoriasisos tünetes bőrben szignifikánsan magasabban expresszálódik, míg az MMP-2 tünetes és tünetmentes bőrben is nagyobb arányban fejeződik ki. A bazális réteg hiperproliferatív területein expresszálódó MMP-3 psoriasisos bőrterületeken nagyobb arányban jelenik meg, az MMP-12 pedig makrofágokkal és bizonyos immunsejtekkel asszociáltan expresszálódik [42].

3. FEHÉRJEKIVONÁSI MÓDSZEREK KÜLÖNBÖZŐ SZÖVETEKBŐL

A különböző szövetek proteomikai vizsgálata fényt deríthet korábban nem vagy csak részben ismert molekuláris funkciók, elváltozások részleteire, és bizonyos betegségek esetén segítheti a pathomechanizmus jobb megértését.

3.1. EXTRAKCIÓ SZÍVBŐL

Barallobre-Barreiro és munkatársai a fibrosisos szív ECM elváltozásaira fókuszáltak, ugyanis a betegség esetén az ECM túlzott lerakódása figyelhető meg. Olyan extrakciós módszert dolgoztak ki, amely a szövet decellularizálásán alapul, és lehetővé teszi az extracelluláris fehérjék biokémiai szubfrakcionálását a szív szöveteiben. Az így kapott alacsony komplexitású frakciók alkalmasak folyadékkromatográfiával kombinált tandem tömegspektrometriás (LC-MS/MS) és egyéb proteomikai technikákkal történő analízisre [12]. Egy olyan háromlépéses extrakciós módszerrel dolgoztak, amely korábban alkalmasnak bizonyult ECM fehérjék extrakciójára vaszkuláris szövetekből [43]. A kivonás lépéseit röviden az 1. táblázat mutatja. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a módszer nemcsak a vaszkuláris szövetek, hanem a szív esetén is alkalmas az ECM fehérjék extrakciójára [12].

A de Castro Bras és munkatársai által alkalmazott ún. Texas három lépéses extrakciós protokoll használata a fentiekhez hasonlóan sikeresnek bizonyult a szív ECM fehérjéinek kivonására. Elsőként optimalizációs lépéseket végeztek. A decellularizációt öt különböző pufferben tesztelték. A sikeres fehérjekivonást az immunoblot, az 1D-SDS-PAGE és a kapilláris HPLC–electrospray ionizációs tandem tömegspektrometriás eredmények igazolták. A Texas három lépéses extrakciót röviden az 1. táblázat ismerteti. [44].

3.2. EXTRAKCIÓ EGÉR PORCSZÖVETBŐL

Brachvogel és munkatársai hasonlóképpen alkalmaztak szekvenciális fehérje extrakciót ECM fehérjék kivonására egér porcszövetből. A kísérlet során összehasonlító proteomikai analízist végeztek egészséges és IX-es típusú kollagén null mutáns egerekkel, amelynek eredményeként feltárták az ECM összetételének változásait, és azonosították a IX-es típusú kollagén interaktom új komponenseit. Kétlépéses szekvenciális fehérje extrakciós technikát alkalmaztak a szövet porítását követően (1. táblázat), majd a mintákat Tris-acetát pufferben EDTA és kondroitináz ABC jelenlétében deglikozilálták. A fehérje koncentrációt Bradford-próbával határozták meg, amit 2D-elektroforézis, tandem tömegspektrometriával és kapilláris HPLC-MS/MS technikával való fehérje azonosítás követett. Az eredmények alapján az extrakció sikeresnek bizonyult; az ECM fehérjék ezzel a kidolgozott módszerrel is hatékonyan vizsgálhatók [45].

3.3. EXTRAKCIÓ BŐRBŐL

Ismertek konvencionális módszerek, melyekkel korábban a bőrből is sikeresen extraháltak fehérjéket. A Parkinson és munkatársai által végzett kísérletben a szövet SDS-sel történő kezelésének hatását vizsgálták *in vivo*. A módszer azonban nemcsak a kezelt, hanem az egészséges szövet vizsgálatára is alkalmas. A kivonáshoz használt pufferek összetétele az 1. táblázatban látható. Az extrahált fehérjéket denaturálást követően 4-12%-os 1D SDS-poliakrilamid gélen szeparálták, majd LC-MS/MS analízissel azonosították. Alkalmaztak úgynevezett izobár jelölésekkel történő jelölést (iTRAQ) jelölést is, amely az expresszált fehérjék relatív mennyiségi meghatározását tette lehetővé. A mintákban összesen 653 különböző fehérjét azonosítottak sikeresen: 159-et az LC-MS/MS, 616-ot az iTRAQ technikával [46].

4. KORÁBBI PROTEOMIKAI EREDMÉNYEK PSORIASISBAN

Az egészséges, psoriasisos tünetes és tünetmentes bőr proteomjának összehasonlításáról számos eredmény áll rendelkezésre.

Ryu és munkatársai psoriasisos tünetes, tünetmentes és normál bőr proteomját hasonlították össze. A bőrminták folyékony nitrogénben történő homogenizálását követően 2D-elektroforézist végeztek, a gélképeket elemezték, a festéket eltávolították, majd tripszines emésztést és extrakciót alkalmaztak. Ezeket LC-MS/MS analízis követte, amit immunoblot és immunhisztokémiai vizsgálatokkal validáltak. A tünetes bőrben a GSTP1, SFN és PRDX2 fehérjék magasabb szintű expresszióját mutatták ki - szemben a tünetmentes és a normál bőrrel, illetve meghatározták ezen celluláris metabolizmusban szerepet játszó fehérjék szöveti lokalizációját is. Az eredmények azt mutatják, hogy a módszer alkalmas a psoriasisos bőrminták proteomikai analízisére. Az egyéni és összesített elemzések eredményeként 36 upregulált fehérjét azonosítottak a psoriasisos bőrben, amelyek közül 25 a biológiai szabályozásban (sejthalál szabályozás, redoxi- és immunfolyamatok), 11 pedig az apoptózis szabályozásában vesz részt. [47].

A psoriasisos proteommal együttesen gyakran vizsgálják a transzkriptomot is, lehetővé téve a komplementaritás kimutatását a celluláris organizáció e két szintje között. Piruzian és munkatársai psoriasisos tünetes és tünetmentes bőrmintákat összehasonlítva sikeresen azonosítottak tíz olyan fehérjét, amelynek expressziója a tünetes bőrben a tünetmenteshez képest legalább kétszeres volt. A tíz azonosított fehérje közül azonban csak hét mutatott transzkriptom szintű eltérést a psoriasisos léziós bőrben. A fehérjék extrakciója ebben az esetben is egy lépésben történt [48].

Az extrakciók során nagy mennyiségben azonosítottak intracelluláris fehérjéket. A detergenssek, mint az SDS [12][44] és Triton-X-100 [48] elősegítik ezen fehérjék kivonását. A Parkinson és munkatársai által végzett extrakció eredményeként azonosított 653 fehérje bizonyítja, hogy meghatározó az extrakció során alkalmazott pufferek összetétele. Az öt különböző pufferben végzett egy lépéses fehérjekivonás lehetővé teszi a fehérjék oldékonyság alapján történő elkülönítését, a módszer előnye, hogy az extrakció az öt pufferben párhuzamosan végezhető, és nem igényel több napon keresztül inkubációt, szemben a kettő-három lépéses módszerekkel. Barallobre-Barreiro és mtsai, valamint de Castro Bras és mtsai hasonlóképpen végezték az extrakciót, főként az extracelluláris fehérjékre fókuszálva. Az általánosan alkalmazott GnHCl, urea, tiourea a pufferekben erős redukáló közeget biztosít, így optimális a fehérje kivonásra. Az összes azonosított fehérjéről számszerű adatok általunk nem ismertek, viszont ECM fehérjék extrakcióját tekintve mindkét módszer hatékonynak bizonyult - annak ellenére, hogy az ECM fehérjék nehezen szolubilizálódnak. Problémát jelentenek a nagy mennyiségben jelen lévő fehérjék, amelyek az extrakció során akadályozhatják egyes kisebb mennyiségben lévő fehérjék azonosítását. Ebből adódhat az egy lépéses módszerek

hátránya, ugyanis ebben az esetben az abundáns fehérjék elkülönítése csak részben vagy esetleg csak további lépések bevonásával lehetséges. Az oldékonyságbeli különbségeken alapuló többlépéses fehérje kivonás bevezetésével csökkenthető az extraktumok komplexitása, így a kis mennyiségben jelen lévő fehérjék azonosítása is lehetővé válik. A módszerek összefoglalója látható az 1. táblázatban.

Szerző	Szövet	Fehérje extrakciós lépések száma	Extrakciós pufferek összetétele	Azonosított fehérjék száma	Fehérjék legfőbb jellemzői
Barallobre-Barreiro és mtsai 2013	szív	3	1. extrakciós puffer: 0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH=7,5 2. extrakciós puffer: 0,1% SDS, 25 mM EDTA 3. extrakciós puffer: 4M GnHCl, 50 mM Na-acetát, 25 mM EDTA, pH=5,8	1. extraktum: 192 2. extraktum: nincs adat 3. extraktum: 228	-proteoglikánok kollagén glikoprotein scaffold fehérjék horgonyzó fehérjék nem strukturális ECM fehérjék , intersticiális folyadék fehérjei egyéb
de Castro Bras és mtsai 2013	szív	3	1. extrakciós puffer: 0,5 M NaCl, 10 mM Tris, 1×PI, pH=7,5 2. extrakciós puffer: 1% SDS PBS-ben, 1×PI 3. extrakciós puffer: 4 M GnHCl, 50 mM Na-acetát, 1×PI, pH=5,8	Összes fehérjéről nincs adat, 20 azonosított ECM fehérje	Fókusz az ECM fehérjékre
Brachvogel és mtsai 2013	egér porc	2	1. extrakciós puffer: 1M NaCl 100 mM Tris-acetát, pH=8,0 2. extrakciós puffer: 4M GnHCl, 65 mM DTT, 10 mM EDTA, 50 mM Na-acetát, pH=5,8	297 3 napos porcból 397 21 napos porcból	Fókusz az ECM fehérjékre
Parkinson és mtsai 2014	humán bőr	1	1-es puffer: 0,5% Nonidet P-40, 0,5% Na-deoxikolát, 10 mM EDTA 100 mM TEAB-ben 2-es puffer: 0,5% amidoszulfobetain-14, 7 M urea, 2 M tiourea, 100 mM TEAB-ben 3-as puffer: 7 M urea, 2 M tiourea, 6 M GnHCl 100 mM TEAB-ben 4-es puffer: 0,1% Rapigest 100 mM TEAB-ben	653	A legnagyobb mennyiségben előforduló fehérjék: keratin, szérum proteinek (hemoglobin, szérum albumin)

			5-ös puffer: 0,1% SDS 100 mM TEAB-ben		
Ryu és mtsai 2011	humán bőr	1	9 M urea, 2% ChAPS, 4M tiourea, 2% IPG puffer, 18 mM DTT, ph= 4-7 kis mennyiségű brómfenolkék	36 azonosított upregulált fehérje 74 azonosított fehérje a psoriasisos tünetmentes területről 145 tünetes területről	intracelluláris fehérjék
Piruzian és mtsai 2010	humán bőr	1	7 M urea, 2 M tiourea, 4% (w/v) CHAPS, 0,5% (w/v) Triton X-100, 0,5% (w/v) amfolin 3/10, 20 mM Tris, 1 mM MgCl ₂ és 0,2 mM PMSF	Összes fehérjéről nincs adat 10 pikkelysömörös léziós bőrben magasabb szinten expresszáldó fehérje	intracelluláris fehérjék

1. táblázat: Fehérje kivonási módszerek összefoglalása

Összességében megállapíthatjuk, hogy számos proteomikai módszert kidolgoztak már a szövetekből történő fehérje extrakcióra, és az extraktumok fehérje tartalmának meghatározására. Számos extrakciós kísérlet egy bizonyos fehérjecsoportra vagy olyan fehérjékre irányul, melyek megváltozott expressziójáról már rendelkezésre állnak adatok. Egy adott szövet teljes proteomjának lefedettségét kevés kísérlet célozza. Legjobb tudásunk szerint jelenleg nem áll rendelkezésre olyan módszer, amely optimális a bőr teljes proteomjának feltérképezésére, ezért szükségesnek láttuk a konvencionális módszerektől eltérő, az egészséges, nem léziós és a léziós bőrterületek fehérje szintű elváltozásinak feltérképezését biztosító, összetett eljárás kidolgozását. Összehasonlítva az egy-, kettő és három lépéses fehérjekivonási módszereket megállapítható, hogy az extrakciós pufferek összetétele és a lépések számának növelése meghatározó. Az általánosan alkalmazott 1D-SDS-PAGE, 2D-elektroforézis hatékonynak bizonyult a fehérjék szeparálása, az LC-MS/MS technika pedig a fehérjék azonosítása során.

III. CÉLKITŰZÉSEK

Patológias körülmények között egyes fehérjék mennyisége módosulhat, sőt bizonyos esetekben bekövetkezhet oldékonyságbeli eltérés, akár a fehérje mennyiségbeli változása nélkül is. Ez utóbbi konvencionális módszerekkel nem vagy csak részben mutatható ki. Célul tűztük ki egy olyan többlépéses fehérjekivonás optimalizálását egészséges donorok bőrmintáin, melynek segítségével a bőr proteomjának minél szélesebb körű lefedése mellett ezek az eltérések is detektálhatóak, és egészséges, tünetmentes és tünetes bőrminták összehasonlításával lehetővé teszi a bőrbetegségekben fehérje szinten bekövetkező elváltozások részletes tanulmányozását.

IV. ANYAG ÉS MÓDSZER

1. ANYAGOK

1.1. Homogenizáláshoz használt anyagok

- folyékony nitrogén
- Gillette-penge
- egészséges donorok bőrmintái
- PBS (foszfát pufferelt sóoldat: 137 mM NaCl (nátrium-klorid), 2,7 mM KCl (kálium-klorid), 10 mM Na₂HPO₄ (dinátrium-hidrogén-foszfát), 1,8 mM KH₂PO₄ (kálium-dihidrogén-foszfát), pH=7,4)

1.2. Szekvenciális fehérjekivonáshoz használt anyagok

1.2.1. Három lépéses fehérjekivonás

1.2.1.1. Első extrakciós puffer

- TBS-Tris pufferelt sóoldat: 50 mM TRIS, 150 mM NaCl desztillált vízben
- 2 mM PMSF (fenil-metil-szulfonil-fluorid)
- 2 mM NEM (N-etilmaleimid)
- 1% PIC (proteináz inhibitor koktél)
- pH=7,4

1.2.1.2. Második extrakciós puffer

- 1M NaCl, 10 mM EDTA (etilén-diamid-szulfoxid), 50 mM TRIS, TBS-ben
- 2 mM PMSF
- 2 mM NEM
- 1% PIC
- pH=7,4

1.2.1.3. Harmadik extrakciós puffer

- 4M GnHCl (guanidin hidroklorid), 10 mM EDTA, 50 mM TRIS, TBS-ben
- 2 mM PMSF
- 2 mM NEM
- 1% PIC
- pH=5,8

1.2.2. Négylépéses fehérjekivonás

1.2.2.1. Első extrakciós puffer

- TBS-TRIS-buffered saline, 50 mM TRIS, 150 mM NaCl (nátrium-klorid)desztillált vízben

- 1% PMSF
- 1% PIC
- pH=7,4

1.2.2.2. Második extrakciós puffer

- 1M NaCl, 25mM EDTA, 50 mM TRIS desztillált vízben
- 1% PMSF
- 1% PIC
- pH=7,4

1.2.2.3. Harmadik extrakciós puffer

- 0,08% SDS (nátrium-dodecyl-szulfát), 25 mM EDTA desztillált vízben
- 1% PMSF
- 1% PIC
- üveggyöngy (glass beads, acid-washed 425-600 microns G8772-10G, 710-1,180 microns G1152-10G, Sigma-Aldrich®)

1.2.2.4. Negyedik extrakciós puffer

- 4M GnHCl, 10 mM EDTA, 50 mM TRIS desztillált vízben
- 1% PMSF
- 1% PIC
- pH=5,8

1.3. Etanol precipitálás során használt anyagok

- 90%-os etanol
- 70%-os etanol mosáshoz
- redukáló puffer (4x Laemmli loading puffer (Protrack No. 00193861, 4M urea,

1.3.1. 1M DTT (ditiotretiol, Fermantas KO311))

1.4. Deglikoziláció során használt anyagok

- Deglikozilációs puffer (4x)
- 600 mM NaCl, 200 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O (nátrium-dihidrogén-foszfát x víz) desztillált vízben
- pH=6,8
- Egyéb
- desztillált víz
- 1% PIC
- 1% PMSF
- kondroitináz ABC (0,05U, Chondroitinase ABC from Proteus vulgaris: C3667-

5UN, Sigma-Aldrich[®])

- endo- β -galaktozidáz (0,05U, Endo-b-Galactosidase from *Bacteroides fragilis*, recombinant expressed in *E. coli* G6920, Sigma-Aldrich[®])
- 8M urea

1.5. Pepszines emésztés során használt anyagok

- 0,5 M ecetsav (pH=2,5)
- pepszin (2500U/mg, 10mg/ml, Pepsine from porcine gastric mucosa P 6887 Sigma-Aldrich[®])
- 5N NaOH (pH=8)

1.6. Fehérjekoncentráció meghatározás során használt anyagok

- 8M urea blank
- pepszines emésztő blank
- első extrakciós puffer blank
- második extrakciós puffer blank
- harmadik extrakciós puffer blank
- negyedik extrakciós puffer blank
- deglikozilációs puffer blank
- desztillált víz
- BSA (bovine serum albumin) hígítási sor (0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10 mg/ml 8M ureában)
- Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (No. 23227)

1.7. Denaturáló poliakrilamid-gélelektroforézishez használt anyagok

- 4-12%-os poliakrilamid grádiens gél (PAGErTM Gold Gels 4-12% 12WELL, 10x10cm, Lonza)
- 8%-os szeparáló, 4%-os gyűjtő gél
- ProSieve Running buffer
- 4x Laemmli mintafelvívó puffer
- 1M DTT (Fermantas KO311)
- 5x gél fixáló oldat (F7264Sigma-Aldrich[®]) (75ml 1x oldat/gél)
- desztillált víz
- Coomassie Brilliant Blue G-colloidal concentrate (Sigma-Aldrich[®])
- metanol
- TBS
- molekulásúly marker (ProSieve Quadcolor Protein marker 4,6-300 kDa)

1.8. Berendezések, programok:

- shaker (BIOSAN Mini Rocker MR-1)
- centrifuga (Heraeus Labfuge 400R)
- poliakrilamid gélelektroforézis futtatókád (BioRad, Lonza)
- nano-HPLC
- LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Scientific)
- PAVA program
- Protein Prospector (ver.:5.10.13)adatbázislekereső program
- Uniprot adatbázis
- Nanodrop 2000 (Thermo Scientific)

2. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Bőrminták levétele, tárolása

Az első előkísérlethez egy 37 éves, a második és harmadik előkísérlethez egy 28 éves nő mellplasztikai műtéte során eltávolított bőrből nyert mintákat használtuk. A donor az eltávolított szövet kísérleti célú felhasználásához beleegyező nyilatkozat aláírásával hozzájárult. A mintákat a feldolgozásig -80°C -on tároltuk.

I. Kísérlet:

1. Bőrminták homogenizálása, előkészítése

Minta porítása folyékony nitrogénben: A vizsgálni kívánt 56,7 mg tömegű bőrmintát folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, fém mozsárban porítottuk és 10 ml-es műanyag csőbe helyeztük.

2. Három lépéses fehérje extrakció

2.1. Első lépés

Az előkészített, homogenizált bőrmintát 2 ml első extrakciós pufferbe (1.2.1.1. pont)tettük, és 4°C -on 24 órán át rázattuk.

2.2. Második lépés:

Az inkubálási idő elteltével a mintát 30 percig, 4°C -on, 5900 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk, majd a leszívott felülúszót -80°C -on tároltuk tovább, a pelletre pedig ráértünk 2 ml-t a második extrakciós pufferből (1.2.1.2. pont), és 24 órán át 4°C -on rázattuk.

2.3. Harmadik lépés:

A második extrakciós lépést követően a mintát 45 percig, 4°C -on, 5900 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk, a felülúszót -80°C -on tároltuk, a fehérjekivonást a pelletből pedig 2 ml harmadik extrakciós pufferben (1.2.1.3. pont) folytattuk 84 órán keresztül, $4-8^{\circ}\text{C}$ -on rázatva, óránkénti 5 perces magas fordulatszámú vortexelés mellett. Az inkubálási idő elteltével 45 percig, 4°C -on, 5900 rpm fordulatszámmal centrifugáltunk, majd a felülúszót és az inszolubilis pelletet -80°C -on tároltuk.

3. Fehérjék precipitálása etanollal

A fehérjék etanolos kicsapását a három lépéses fehérjekivonás során létrehozott felülúszókból végeztük el. 100-100 μl felülúszót tízszeres térfogatú, 90%-os etanolban precipitáltunk 16 órán át, 4°C -on. Ezt követően 30 percig, 4°C -on, 13 000 rpm fordulatszámmal centrifugálást végeztünk, a felülúszót eltávolítottuk, és a pelletet 70%-os etanollal mostuk. Az etanol eltávolítása után a pelletet szobahőmérsékleten

beszárítottuk, és felvettük 20-20 µl redukáló pufferbe (Laemmli loading buffer, 4M urea, 0,05M DTT) (1.3. pont).

4. Fehérjekoncentráció meghatározása BCA-módszerrel

A módszert a BCA Protein Assay kit használatával, a gyártó utasításai szerint végeztük el.

5. Fehérjék szeparálása denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel (1D SDS-PAGE)

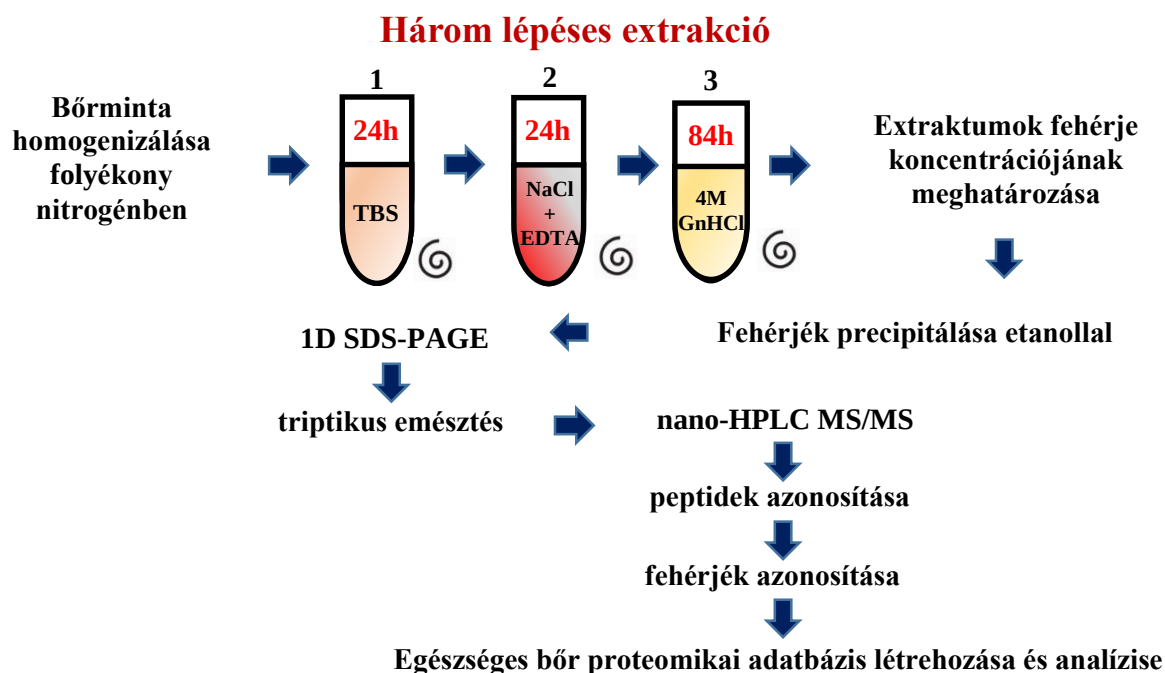
A mintákat 98°C-on, 90 sec-ig forraltuk, majd ezt követően röviden lecentrifugáltuk. A futtatást ProSieve Runningpufferben végeztük 8%-os szeparáló, 4%-os gyűjtő gélen, BioRad típusú futtatókádban. A futtatást 120V feszültséggel indítottuk, majd 10 perc elteltével megnöveltük 240V-ra, a folyamat végéig. Ezt követően a gél 20-30 másodpercre desztillált vízbe helyeztük, majd 30 percig az előre elkészített fixáló oldatban ráztuk, amit háromszor 20-30 másodperces desztillált vizes mosás követett (1.7. pont).

6. Fehérjék detektálása poliakrilamid gélen Coomassie kék festéssel

A festéket desztillált vízzel hígítottuk, majd 4:1 arányú festék-metanol elegyet készítettünk, melyet a fixált gélre öntöttünk. A gél a festékben ráztuk 90 percen keresztül. Az aspecifikus festődést a gélből TBS-sel távolítottuk el (1.8. pont).

7. Fehérjék azonosítása nano-HPLC MS/MS technikával

Ezt a lépést az MTA-SZBK Proteomikai Kutatócsoportja végezte el a következők szerint: A mintákat redukálás (DTT) és alkilálás (IAM) után tripszinnel emésztették, 4 órán keresztül 37°C-on. Az emésztési elegyeket nano-HPLC szeparálás után LTQ-Orbitrap Elite (Thermo) tömegspektrométeren analizálták. A 4M urea jelenlétében történő főzés nem eredményezett karbamilezett peptideket. A generált csúcslistákat PAVA programmal készítették, majd az egy-egy gélcsávhoz tartozó csúcslistákat összeesomagolták és egyben keresték le a Protein Prospector (ver.:5.10.13) adatbázislekereső program segítségével.



1. ábra: I. Kísérlet

II. Optimalizálási kísérlet

1. Bőrminták homogenizálása, előkészítés

Mintaporítása folyékony nitrogénben: a vizsgálni kívánt megfelelő tömegű (209,3 mg) bőrmintát 2 ml PBS-sel (1.1. pont) mostuk, majd a mosás után 1 percig 10 000 rpm fordulatszámmal ülepítettük. Ezt követően folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, fém mozsárban porítottuk és 2 ml-es csőbe helyeztük.

2. Néglépéses fehérjeextrakció

2.1. Első lépés:

A 209,3 mg tömegű, előkészített, homogenizált bőrmintát 5 ml-es fecskendőre helyezett 50 mm-es injekciós tűvel, tömegéhez képest tízszeres térfogatú első extrakciós pufferben reszuszpendáltuk (1.2.2.1. pont), majd magas fordulatszámu vortexelés után 24 órán keresztül 4°C-on ráztattuk.

2.2. Második lépés:

A következő nap a mintákat 10 percig vortexeltük, majd 30 percig, 4°C-on 10 000 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk. A felülúszót -80°C-os fagyasztóba helyeztük, a pelletet a szövet tömegéhez képest tízszeres mennyiségű első extrakciós pufferrel mostuk, majd centrifugálással ülepítettük 3x1 percig, 10 000 rpm fordulatszámmal. A felülúszót eltávolítottuk, ráértük a szövet tömegéhez képest tízszeres térfogatú második extrakciós puffert (1.2.2.2. pont), a mintát tűvel reszuszpendáltuk, vortexeltük, és 24 órán keresztül 4°C-on ráztattuk.

2.3. Harmadik lépés:

Az inkubációs idő elteltével az előző pontban leírtak alapján végeztük a vortexelést, centrifugálást, tárolást és a pellet mosását a második extrakciós pufferrel. Ezt követően a pelletre ráértük a tízszeres térfogatú harmadik extrakciós puffert (1.2.2.3. pont), a pelletet tüvel reszuszpendáltuk és 8 órán keresztül ráztattuk szobahőmérsékleten, óránkénti 5 perces, magas fordulatszámú vortexelés mellett.

2.4. Negyedik lépés:

Az inkubációt követően a mintákat 10 percig vortexeltük, majd 30 percig centrifugáltuk 4°C-on, 10 000 rpm fordulatszámmal, és a felülúszót -80°C-on tároltuk a további felhasználásig. Mivel az SDS és a GnHCl nem kompatibilis, a pelletet 5-ször mostuk desztillált vízzel az SDS eltávolítására, a mosások között 10 000 rpm fordulatszámmal centrifugáltunk 1-1 percig. Ezt követően a pelletre ötszörös térfogatban ráértük a negyedik extrakciós puffert (1.2.2.4. pont), és 84 órán keresztül rázógépen inkubáltunk 4°C-on, óránkénti, 5-5 perces vortexelés mellett. A 84 óra elteltével 30 percig, 4°C-on 10 000 rpm fordulatszámmal centrifugálást végeztünk, majd a felülúszókat és a pelletet -80°C-on tároltuk.

3. Fehérjék precipitálása etanollal

A fehérjék etanolos kicsapását a négylépéses fehérjekivonás során létrehozott felülúszókból végeztük el. 100-100 µl felülúszót tízszeres térfogatú, 90%-os etanolban precipitáltunk 16 órán át, 4°C-on, majd 16 órán át -20°C-on. Ezt követően 30 percig 4°C-on 13 000 rpm fordulatszámmal, centrifugálást végeztünk, a felülúszót eltávolítottuk, és a pelletet 70%-os etanollal mostuk. Az etanol eltávolítása után a pelletet szobahőmérsékleten beszárítottuk és felvettük 20-20 µl redukáló pufferbe (4x Laemmli loading buffer, 0,05 M DTT (1.3. pont))

4. Fehérjék koncentrációjának meghatározása, szeparálása, detektálása és azonosítása

A fehérjekoncentráció meghatározását és a szeparálást a háromlépéses extrakciónál leírtakhoz hasonlóan végeztük, azzal a különbséggel, hogy a futtatás 4-12%-os grádiens gélen Lonza típusú futtatókádban történt. A fehérjéket a poliakrilamid gélen Coomassie kék festéssel detektáltuk, a fehérjék azonosítását nano-HPLC MS/MS technikával végeztük.

III. optimalizálási kísérlet

1. Bőrminták darabolása, előkészítés

Folyamatosan jégen dolgozva, Petri-csészében a fagyasztott bőrmintákból Gillette penge segítségével 167,9 mg tömegű mintát vettünk és apró darabokra vágtuk, majd 2 ml-es csőbe helyeztük. Ezt követően a kimért mintát kettő-három alkalommal feltisztulásig mostuk 2-2 ml PBS-sel. A mosások között 1-1 percig 10 000 rpm fordulatszámmal ülepítettünk.

2. Négylépéses fehérje extrakció

A fehérjekivonást a második előkísérlet mintájára végeztük el.

3. Fehérjék precipitálása, koncentráció meghatározása, szeparálása, detektálása, azonosítása

A harmadik előkísérlet során a második előkísérlet következő lépéseit a korábbiakkal azonos módon végeztük el: a fehérjék precipitálását etanollal, a koncentráció meghatározást BCA-módszerrel, a fehérjék szeparálását 1D-SDS-PAGE-el, a fehérjék detektálását poliakrilamid gélen Coomassie kék festéssel, és a fehérjék azonosítását nano-HPLC MS/MS technikával.

4. Egyéb módszerek

1. Deglikozilálás

A negyedik frakció megszárított, alkoholosan kicsapott fehérjeit 1x deglikozilációs pufferben szolubizáltuk, 0.05 U deglikozilációs enzimek (kondroitináz ABC, endo- β -galaktozidáz), 1% PIC, és 1% PMSF jelenlétében, és 37°C-on, egy éjszakán át ráztattuk.

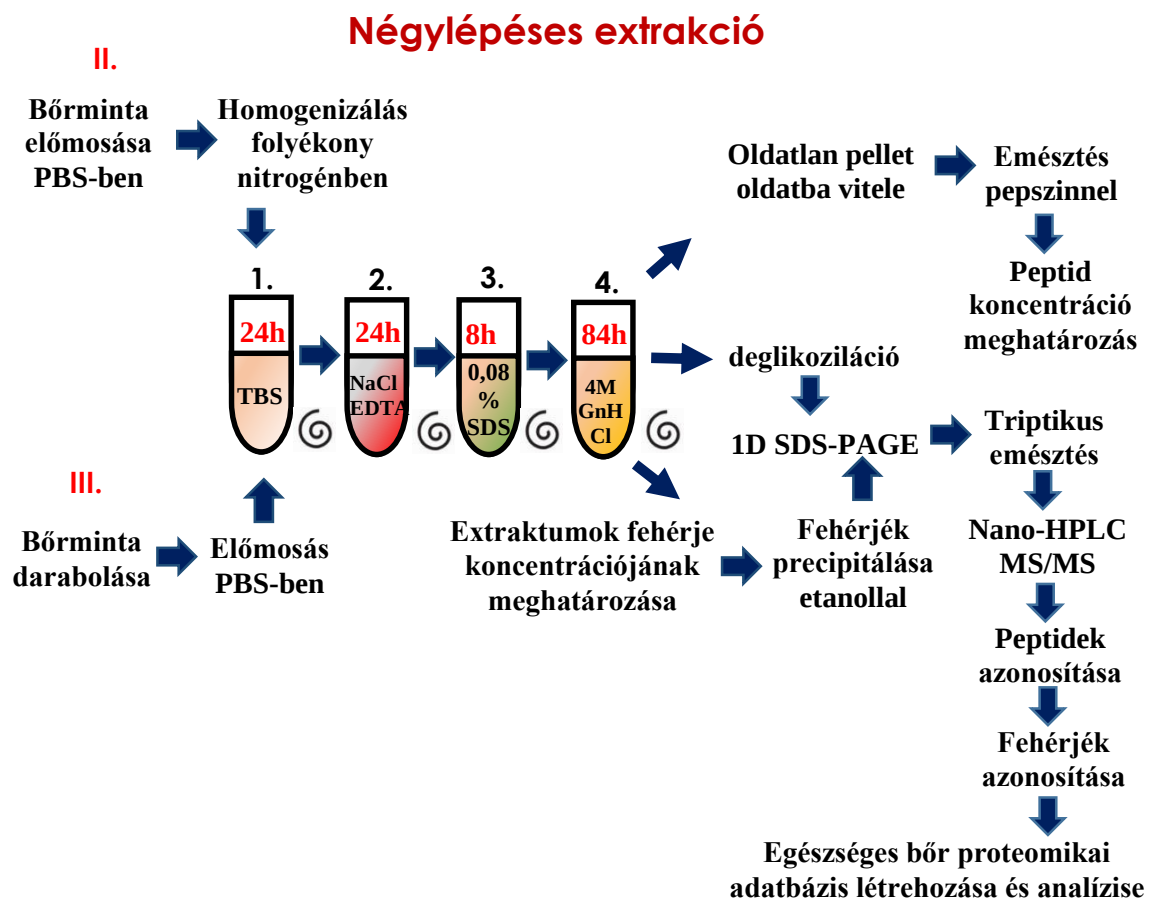
2. Emésztés pepszinnel

Pepszines emésztést a deglikozilált pelleten és az etanol-precipitált frakciókon végeztünk. A mintákat 1,5 ml-es Eppendorf-csővekben, 500 μ l 0,5M ecetsavban, egy éjszakán át, 4°C-on ráztattuk, majd 30 percig, 4°C-on, 10 000 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk. Ha lehetett pelletet látni, ezt az inkubációs lépést megismételtük. A felülúszóhoz 50 μ l pepszint adtunk, és 37°C-on, 30 percig ráztattuk. A reakciót 200 μ l 5N NaOH-dal állítottuk le.

3. Fehérjekoncentráció meghatározása nanodrop technikával

Nanodrop 2000 eszköz és szoftver segítségével határoztuk meg az extraktumok koncentrációit, 660 nm-en az etanol precipitált, ureában felvett minták, 260-280nm-en az etanol precipitálás előtti, a pepszinnel emésztett, és a deglikozilált minták koncentrációit. Az ureában felvett, etanol precipitált extraktumok koncentrációjának meghatározásához BSA-hígítási sorozatot készítettünk (0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10 mg/ml 8M

ureában). A koncentráció meghatározáshoz minden mintánál 2 µl-t mértünk az eszköz mérőfejére, az egyes minták között a fejet letisztítottuk, és megfelelően kalibráltuk.



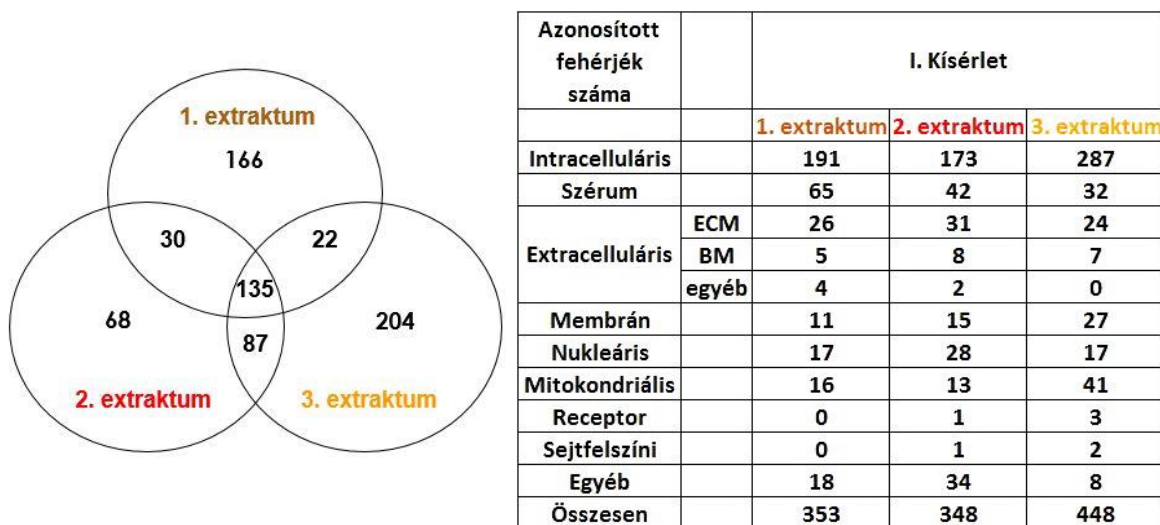
2. ábra: II. és III: optimalizálási kísérlet

V. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESLÉSEK

1. EREDMÉNYEK

I. KÍSÉRLET

A kísérletet IV/2/I. pontba leírtak alapján végeztük, a módszer sémája a 1. ábrán látható. A három lépésű fehérje extrakció eredményeként sikeresen azonosítottunk 712 különböző fehérjét, amelyek szám szerinti eloszlása az egyes extraktumokban a 3. ábrán látható. A meghatározott fehérjéket extraktumként csoportosítottuk lokalizáció szerint az Uniprot adatbázis segítségével (4. ábra).



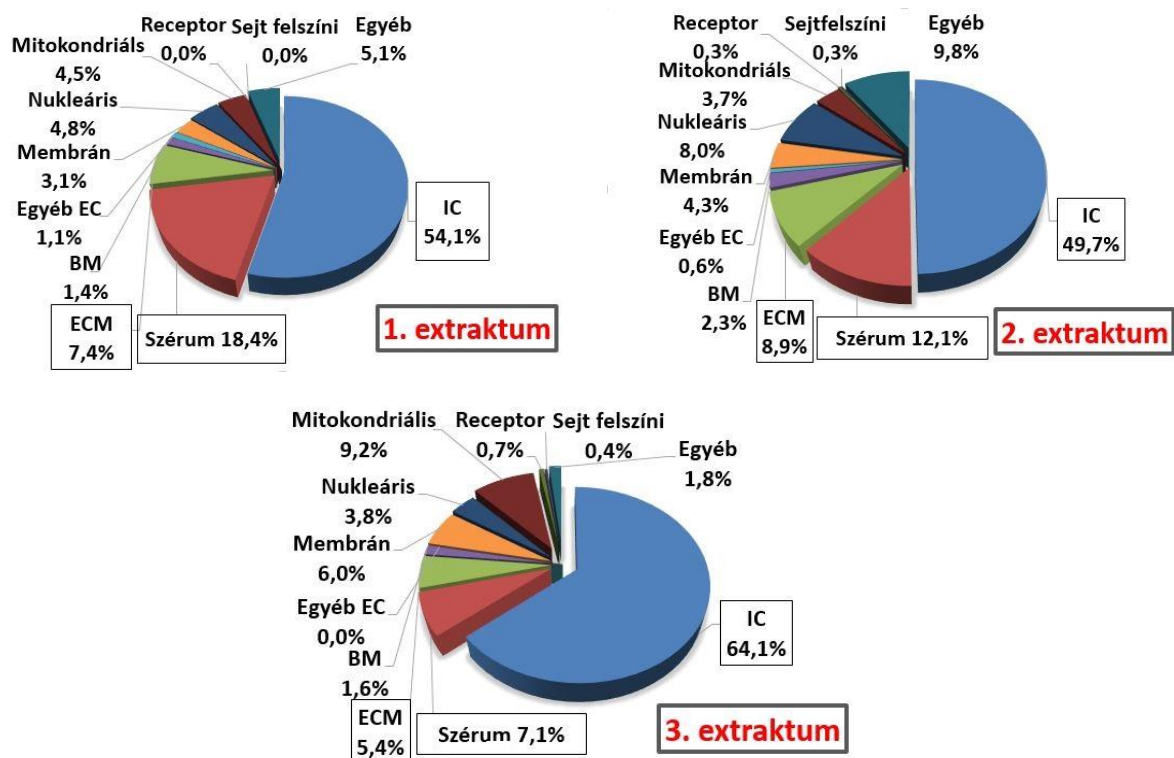
3. ábra: Fehérjék szám szerinti eloszlása a három extraktumban és lokalizáció szerint

Az első extrakciós puffer a könnyen oldódó, újonnan szintetizált, lazán kötött fehérjék kivonására irányult, a második a divalens kationoktól függő interakcióban lévő fehérjék extrakciójára, a harmadik extrakciós puffer pedig erős redukáló közeg volt a fehérjék számára. Az azonosított 712 fehérje közül 135 mindhárom extraktumban, 139 a három extraktum közül kettőben, 438, tehát a fehérjék több mint 60%-a pedig a három extraktum közül kizárólag az egyikben volt jelen (166 az elsőben, 68 a másodikban, 204 a harmadikban (3. ábra).

A vártnál nagyobb arányban azonosítottunk szérumfehérjéket (7-18% között), amelyek jelenléte nem releváns az általunk végzett analízis szempontjából.

Kiválogattuk azokat az ECM illetve szekretált fehérjéket, amelyeket már kapcsolatba hoztak a psoriasisos, tünetes vagy tünetmentes bőrrel mutációt vagy megváltozott expressziót mutattak (2. táblázat). Az azonosított fehérjék közül 19% extracelluláris, 8% ECM fehérje. A sejtproliferációval, differenciációval, apoptózissal és T sejt regulációval kapcsolatos,

psoriasis szintén összefüggésbe hozott fehérjét szintén összesítettük és kategorizáltuk az egészséges bőrben azonosított proteomból (3. táblázat)



4. ábra: Fehérjék százalékos aránya a három extraktumban

Fehérje neve	Oldódási profil(%)			Ismert asszociáció	Hivatkozás
	1. extraktum	2. extraktum	3. extraktum		
I-es típusú kollagén	23	49	28	tm+	Koivukangas V et al., 1995
Annexin	23	55	22	t+	Kitajima Y et al., 1991
Dekorin	8	19	73	t-	Velez-DelValle C et al., 2011
Galektin	55	13	32	tm-, t-	de la Fuente H et al., 2012
Laminin	23	54	22	tm-, t-	McFadden JP et al., 2013
Fibronectin	30	45	25	tm+	Bata-Csörgő Zs et al., 1998
Trombospondin	50	50	0	tm-, t-	Nickoloff BJ et al., 1994
Triptáz β-2	55	45	0	t+	Harvima IT et al., 2012
TIMP	100	0	0	t+	Adamson A et al., 2013
MMP-2	0	100	0	t+	Vasku V et al., 2009

2. táblázat: Jelentős ECM és szekretált fehérjék psoriasisban 1.

(t=tünetes bőr, tm= tünetmentes bőr)

Fehérje neve	Oldódási profil (%)			Funkció	Ismert asszociáció	Hivatkozás
	1. extraktum	2. extraktum	3. extraktum			
Hornerin	21	35	44	proliferáció	t+	Takaishi M et al., 2005
Peroxiredoxin-2	51	29	20	proliferáció	tm+,t+	Ryu J et al., 2011
Kaspáz-14	100	0	0	differentiáció	t-	Hsu S et al., 2007
Zsír-sav-kötő fehérje	31	38	31	differentiáció	t+	Williamson JC et al., 2013
Szerotonin transzporter fehérje	100	0	0	apoptózis	t+	Thorslund K et al., 2013
14-3-3 fehérje	70	13	17	proliferáció	t-	Man X et al., 2013
Dipeptidil peptidáz-4	0	100	0	T-sejt reguláció	t+	van Lingen RG et al., 2008
Kluszterin	0	0	100	apoptózis	plazma+	Garcia Rodriguez S et al., 2013

3. táblázat: Jelentős ECM és szekretált fehérjék psoriasisban 2.
(t=tünetes bőr, tm= tünetmentes bőr)

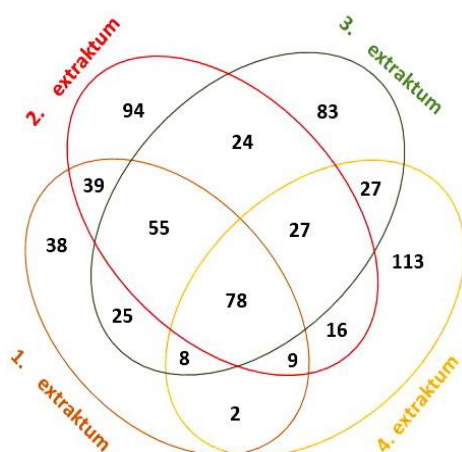
II. OPTIMALIZÁLÁSI KÍSÉRLET

A kísérletet a IV/2/II pontban leírtak alapján, a 2. ábra sémája szerint végeztük. Az első előkísérlet eredményeiből kiindulva bevezettük a PBS-ben történő előmosást a szérumfehérjék csökkentésére. Az eredmények alapján a szérumfehérjék arányának még hatékonyabb csökkentése szükséges.

A szekvenciális fehérjekivonás során az intracelluláris és membránfehérjék hatékonyabb elválasztása érdekébenutolsó előtti lépésként beiktattuk az SDS-tartalmú pufferben atörténő extrakciós lépést, melynek eredményeként a harmadik extraktumba koncentráldott a nukleáris fehérjék többsége.

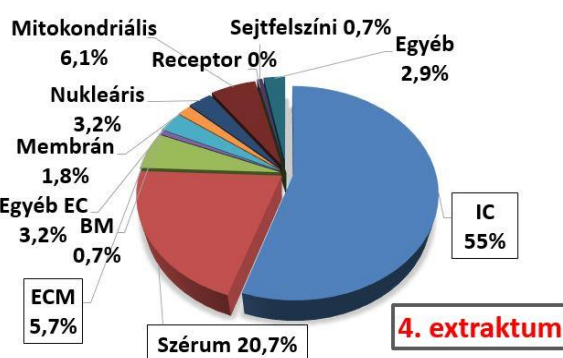
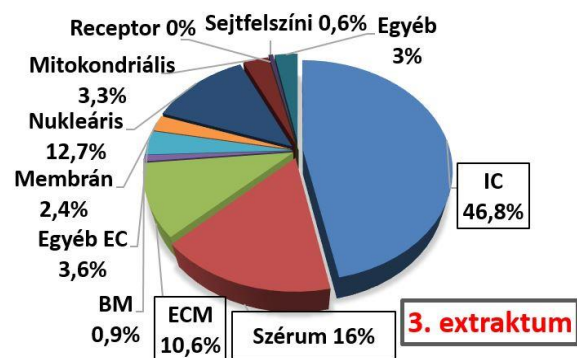
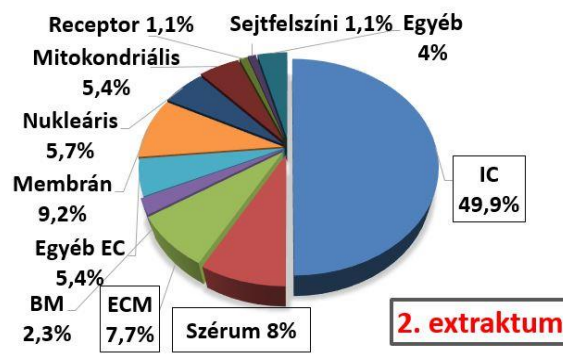
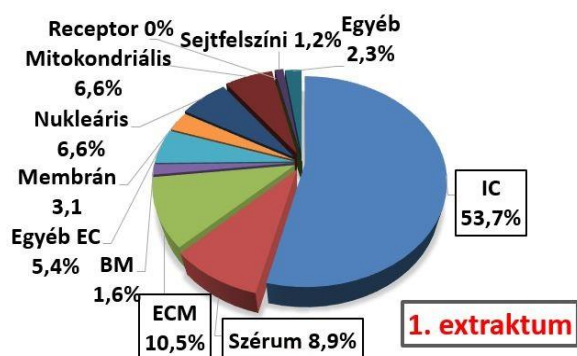
Sikeresen azonosítottunk 638 különböző fehérjét, amelyek szám szerinti eloszlása a különböző extraktumokban az 5. ábrán látható. Az azonosított fehérjéket itt is extraktumonként, lokalizáció szerint csoportosítottuk, Uniprot adatbázissal. (6. ábra).

Az azonosított 638 fehérje közül 78 mindhárom pufferben, 328 fehérje (38 az elsőben, 94 a másodikban, 83 a harmadikban, 113 a negyedikben) - mely az összes fehérje több mint 50%-a - kizárólag az egyik pufferben szolubilizálódott, és csökkent a mindhárom extraktumban jelen lévő fehérjék száma. (5. ábra) Az első kísérlethez hasonlóan az utolsó extraktumban kaptuk a legtöbb fehérjét.



Azonosított fehérjék száma	II. Optimalizálási kísérlet			
	1. extraktum	2. extraktum	3. extraktum	4. extraktum
Intracelluláris	136	174	155	154
Szérum	23	28	53	58
Extracelluláris	ECM	27	27	35
	BM	4	8	3
	egyéb	14	19	12
Membrán	8	32	8	5
Nukleáris	17	20	42	9
Mitokondriális	17	19	11	17
Receptor	0	4	0	0
Sejtfelszíni	3	4	2	2
Egyéb	6	14	10	8
Összesen	255	349	331	280

5. ábra: A fehérjék szám szerinti eloszlása a négy extraktumban és lokalizáció szerint



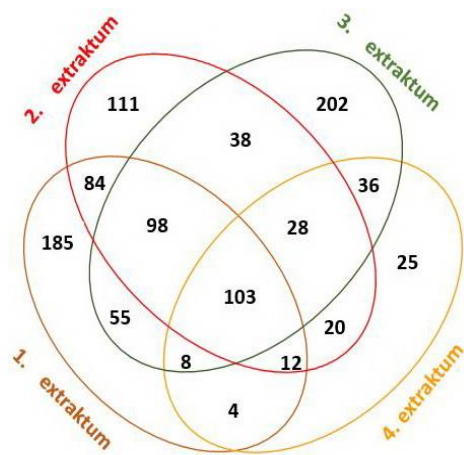
6. ábra: Fehérjék százalékos aránya a négy extraktumban és lokalizáció szerint

III. OPTIMALIZÁLÁSI KÍSÉRLET

A kísérletet többlépésben módosítva, a IV/2/III.pontban leírtak alapján végeztük, melyet a 2. ábra mutat be. Annak meghatározására, hogy a minta előkészítésnek van-e hatása az azonosítható fehérjék számára, a bőrmintát Gillette-pengével daraboltuk. Az új módszerrel 1009 különböző fehérjét azonosítottunk, amelyek szám szerinti eloszlását a négy extraktumban a 7.ábra foglalja össze. Az előző kísérletekkel azonos módon a fehérjéket lokalizáció szerintsorba rendeztük (8. ábra). Csak 103 fehérje jelent meg mind a négy, és 523 kizárólag az egyik extraktumban (185 az elsőben, 111 a másodikban, 202 a harmadikban, 25 a negyedikben) (7. ábra). Kizárólag az utolsó extraktumban az első előkísérlet során a fehérjék közel 29%-a, a második előkísérlet során több mint 17%-a, a harmadik kísérlet során 2,5%-a szolubilizálódott.

A többszörös PBS-ben végzett előmosás eredményeként sikerült a szérumfehérjék arányát a négy extraktumban 5-9%-ra csökkenteni a korábbi 7-18%-kal (I. Kísérlet) és 8-21%-kal (II. Optimalizációs kísérlet) szemben.

Összehasonlítva az extracelluláris fehérjék eloszlását a három kísérlet során, a három lépéses extrakció eredményeként átlagosan a három extraktumban 9,56%-ban, a néglépéses extrakciók során pedig 14,4%-ban illetve 13,1%-ban jelentek meg. Az extracelluláris mátrix fehérjék az első két kísérlet extraktumaiban közel azonos százalékos arányt mutattak, a harmadik kísérletben viszont az első extraktumban arányuk megemelkedett.

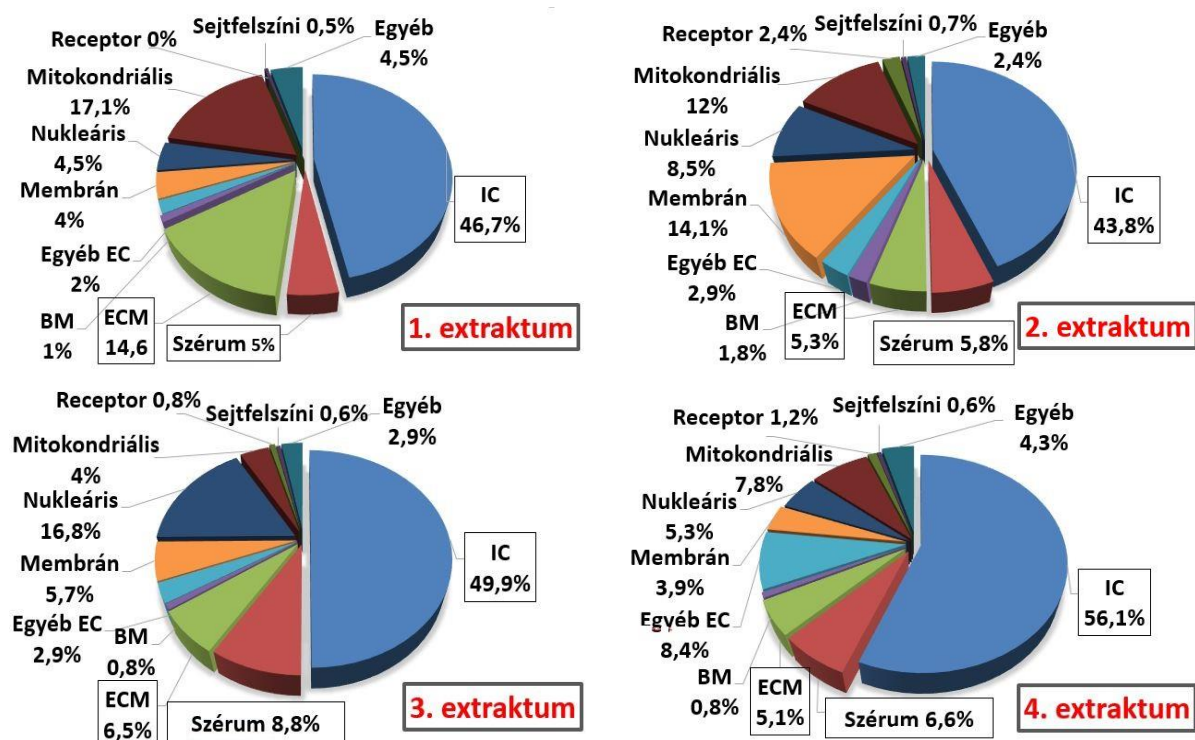


Azonosított fehérjék száma		III. Optimalizálási kísérlet			
		1. extraktum	2. extraktum	3. extraktum	4. extraktum
Intracelluláris		93	240	237	287
Szérum		10	32	42	34
Extracelluláris	ECM	29	29	31	26
	BM	2	10	4	4
	egyéb	4	16	14	43
Membrán		8	77	27	20
Nukleáris		9	48	80	27
Mitokondriális		34	66	19	40
Receptor		0	13	4	6
Sejtfelszíni		1	4	3	3
Egyéb		9	13	14	22
Összesen		199	548	475	512

7. ábra: Fehérjék szám szerinti eloszlása a négy extraktumban és lokalizáció szerint

A második előkísérlethez hasonlóan a harmadik előkísérletben is - az SDS-nek köszönhetően - a harmadik extraktumban azonosítottunk nukleáris fehérjéketa legnagyobb arányban.

A sejtfelszíni és receptor fehérjék - az előző kísérletekhez hasonlóan - alacsony százalékban voltak azonosíthatók.



8. ábra: Fehérjék százalékos eloszlása a négy extraktumban és lokalizáció szerint

A négylépéses előkísérleteknél is kiválogattuk azokat az ECM illetve szekretált fehérjéket, amelyeket már kapcsolatba hoztak psoriasisal, alacsonyabb, vagy magasabb szinten jelentek meg tünetes vagy tünetmentes bőrben (4. táblázat).

Fehérje neve	Oldódási profil(%)				Ismert asszociáció	Hivatkozás
	1. extraktum	2. extraktum	3. extraktum	4. extraktum		
Kalmodulin-szerű fehérje	0	0	100	0	t+	Méhul B et al., 2006
Kimáz	27	4	69	0	t-	Harvima IT et al., 1999
I-es típusú kollagén	60	5	24	11	tm+	Koivukangas V et al., 1995
Dekarin	19	73	6	2	t-	Velez-DelValle C et al., 2011
Fibronectin	0	28	25	47	tm+	Bata-Csörgő Zs et al., 1998
Galektin-1	9	27	41	23	tm-, t-	de la Fuente H et al., 2012
Laminin	0	61	0	39	tm-, t-	McFadden JP et al., 2013
Periosztin	35	24	39	2	t-	Zhou HM et al., 2010
Trombospondin-1	0	0	61	39	tm-, t-	Nickoloff BJ et al., 1994
Cink- α -2-glicoprotein	11	35	14	40	t-	Chen SH et al., 2000

4. táblázat: Jelentős ECM és szekretált fehérjék psoriasisban 3.

IV. TOVÁBBI KÍSÉRLETEK

A deglikoziláció és a pepszines emésztés optimalizálása jelenleg is folyamatban van.

V. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A bőrbetegségek háttérében lévő molekuláris szintű elváltozások mélyebb megismerését szolgálja a minták proteomikai vizsgálata. Bár számos bőrbetegség részjelenségét képezik az ECM elváltozásai, célzottan erre irányuló optimalizált fehérje kivonási módszer - információink szerint –ezidáig nem állt rendelkezésre. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a többlépéses fehérje extrakció csökkenti az extraktumok komplexitását, a különböző nagy mennyiségben jelen lévő fehérjék oldékonyságuknak megfelelően elkülönülnek, ezáltal a kisebb mennyiségben jelen lévő fehérjék azonosítása hatékonyabbá válik. Patológias körülmények között egyes fehérjék mennyisége módosulhat, sőt bizonyos esetekben mennyiségbeli változásuk nélkül is bekövetkezhet oldékonyságbeli eltérés. Ez utóbbi konvencionális módszerekkel nem vagy csak részben mutatható ki, azonban az általunk kidolgozott eljárással detektálható.

1. OPTIMÁLIS MINTAMENNYISÉG MEGHATÁROZÁSA

A módszer kidolgozása során elsőként az optimális minta mennyiségét határoztuk meg. A vizsgálatunk alapjául szolgáló kísérlet [12] extrakciós oldatai 30-50 mg myocardiumra vonatkoznak. Teljes vastagságú bőrből 40-52 mg szövetszövetmennyiségre vonatkozóan találtunk eredményeket [46] [48], így elsőként egy ezt megközelítő mintamennyiséggel, 56,7 mg szövetrel dolgoztunk. A későbbiekben – további irodalmi adatokra hagyatkozva [44]- kisebb és nagyobb tömegű (12 mg – 209,3 mg) mintákon is végeztük az extrakciót. Kísérletes eredményeinkre hagyatkozva a 150 mg körüli szövetszövetmennyiséget találtuk optimálisnak.

2. MINTA ELŐKÉSZÍTÉS OPTIMALIZÁLÁSA

A minta előkészítésével kapcsolatosan az irodalomban találkozhatunk homogenizátor[49], szövetdaráló[45], kerámia gyöngyök [46], vagy lízis puffer alkalmazásával [44][48], folyékony nitrogénben történő porítással [47] és darabolással [12]. Az eszközöket a szennyeződés veszélye miatt, a lízis puffert a fehérjék kioldódása miatt elvetettük. Az üveggyöngyök használata kísérleteinkben megnehezítette a pellet és a felülúszó (extraktum) centrifugálással történő elválasztását. Folyékony nitrogénben homogenizált, illetve darabolással előkészített mintákkal dolgoztunk, melyek közül a darabolással való előkészítés bizonyult a leghatékonyabbnak.

3. A HÁROM ÉS NÉGYLÉPÉSES EXTRAKCIÓ

A háromlépéses extrakció alkalmasnak bizonyult a bőr proteom nagy lefedettségű vizsgálatára, azonban további optimalizálási lépéseket tartottunk szükségesnek: PBS-sel való előmosást, SDS tartalmú pufferrel való extrakciós lépés bevezetését és 4-12%-os grádiens gél alkalmazását. Továbbá ismert, hogy a poszttranszlációs módosítások eredményeként a fehérjékhez kötött szénhidrátláncok a szeparálás során akadályozzák a fehérjék gélbe lépését, ezek a láncok deglikozilációs lépés beiktatásával megbonthatók, és növelik az elválasztás hatékonyságát[12].

Az SDS tartalmú pufferrel való extrakciós lépés beiktatása csökkentette mind az összfehérje, mind az intracelluláris fehérjearányt az utolsó, GnHCl tartalmú extraktumban. Grádiens gél alkalmazásakor hatékonyabb volt a fehérje elválasztás, szemben a 8%-os szeparáló és 4%-os stacking gél használatával. A deglikoziláció viszont a gélkép alapján még optimalizálási lépéseket igényel. Mindemellett a negyedik lépés végén visszamaradt pellet fehérje összetételének megismeréséhez pepszines emésztést tartottunk szükségesnek.

Mind a három, mind pedig a négylépéses fehérje kivonás eredményeiből látható, hogy bár a frakciók lokalizáció szerinti összetétele nagyon hasonló, az egyes fehérjék oldékonyságában jelentős különbségek vannak, ezáltal jól frakcionálhatók. Ezt igazolja, hogy a fehérjék több mint 50%-a kizárólag az egyik pufferben szolubilizálódott.

A PBS-sel történő mosás következtében az első extraktumokban jelentős mértékben csökkent a szérum fehérjék száma, ugyanakkor a vizsgálatunk tárgyát képező fehérjék száma szinte nem változott. Összességében a kísérletek előrehaladtával több fehérjét azonosítottunk, melyhez a PBS-sel való mosás mellett hozzájárult a minta darabolással való előkészítése is, hiszen a darabolt mintákban a sejtek és az ECM jelentős része intakt maradt.

Irodalmi adatokat tekintve kísérletünkhöz leginkább Barallobre-Barreiro illetve Parkinson és munkatársainak módszere közelít. Az előbbi szerző egy három lépéses kivonási módszert közöl egér myocardiumból, melynek eredményeképpen az első extraktumban 192, az utolsóban 228 fehérje került azonosításra[12]. Parkinson és kutatócsoportja 653 fehérjét ötször egy lépésben vont ki. Esetükben azonban nagy számban voltak jelen keratinok és szérum fehérjék, továbbá a bőr irritáció szempontjából lényeges fehérjéket emelték ki[46]. Információink szerint az általunk létrehozott normál bőr fehérje adatbázis kvalitatív szempontból az egyik legszélesebb körű. Kísérleti elrendezésünk a célszövet, a módszer és a vizsgálat fókuszát képező fehérjék szempontjából is újszerű.

A jelenleg ismert, szövetspecifikusan expresszáldó 130-140 ECM és BM fehérje közül 51-et (45 ECM, 6 BM) azonosítottunk. ECM fehérjék szempontjából is kedvezőnek bizonyult a négylépéses extrakció: bár a legtöbb ECM fehérjét az első extraktumban találtuk, közel fele a további extraktumokban került azonosításra.

Ezen optimalizált körülmények mellett tervezzük elvégezni a pikkelysömörös léziós, nem-léziós és egészséges bőrminták (n=5, 3 replika) proteomikai összehasonlítását. A proteomikai módszerünkkel detektált különbségeket további két független módszerrel tervezzük validálni: a mennyiségi és oldékonyságbeli különbségeket Western blot analízissel, a szöveti lokalizációt és relatív mennyiséget pedig immunfestéssel. A kapott proteomikai adatbázis feldolgozását bioinformatikai módszerekkel végezzük majd. Emellett az egyes extraktumok összetételének, a fehérjék eloszlásának, struktúrájának morfológiai vizsgálatát elektronmikroszkóppal, a szövetminták felszíni sajátosságait, a molekulák vizuális tulajdonságait, a molekulák illetve szövetfelszínnek közötti kölcsönhatásokat pedig atomerő mikroszkópos vizsgálattal tervezzük elemezni.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

Egyes multifaktoriális bőrbetegségek hátterében meghúzódó fehérje szintű elváltozások széleskörű megismeréséhez az egyik legalkalmasabb módszer a biopsziák proteomikai analízise. Az analízis során különösen fontos az ECM vizsgálata is, melynek elváltozásai több bőrbetegség részjelensége, vagy kiváltó oka is lehet. Egészséges és beteg bőrminták összehasonlításával számos fehérje szintű elváltozás kimutatható, pikkelysömör esetén például már a betegek tünetmentes bőrterületein is megfigyelhetők eltérések. Bár számos fehérje kivonási módszert alkalmaznak más szövetekben, amely ECM részletes vizsgálatát is célozza, bőrből történő optimalizált kivonási módszer legjobb tudásunk szerint nem áll rendelkezésre.

Patológiás körülmények között bizonyos fehérjéknél bekövetkezhet oldékonyságbeli eltérés, akár a fehérje mennyiségbeli változása nélkül is, mely konvencionális módszerekkel nem mutatható ki. Ezen eltérések részletes megismerésével új funkcionális aberrációkra deríthetünk fényt. Kísérletes munkáinkban ezért célul tűztük ki egy olyan többlépéses fehérjekivonás optimalizálását, melynek segítségével ezek az eltérések is detektálhatóak, és egészséges, tünetmentes és tünetes bőrminták összehasonlításával lehetővé teszik a bőrbetegségekben fehérje szinten bekövetkező elváltozások részletes tanulmányozását.

Egészséges donortól vett bőrmintákat két módszerrel, folyékony nitrogénben való porlasztással és darabolással homogenizáltunk. Elsőként háromlépéses fehérjekivonást végeztünk: 1. extrakció TBS pufferben, 2. extrakció magas sókoncentrációjú és EDTA tartalmú pufferben, 3. extrakció guanidin-hidrokloridot tartalmazó pufferben. Az extraktumok fehérjeit 1D SDS-PAGE és nano-HPLC MS/MS analízissel azonosítottuk. Ezt követően a szekvenciális fehérjekivonást utolsó előtti lépésként SDS tartalmú pufferrel történő extrakcióval bővítettük. Végül 4-12%-os gradiens gélen való szeparálást végeztünk, az extrakció sorozat befejezéséként visszamaradt pelletet pedig pepszinnel emésztettük.

A háromlépéses extrakció eredményeként több mint 700 különböző fehérjét azonosítottunk. Mivel a vártnál nagyobb arányt képviseltek a szérumfehérjék, PBS-sel való előmosást iktattunk be. Az intracelluláris fehérjék hatékonyabb kivonása érdekében bevezettük az SDS tartalmú pufferrel való extrakciót. A fehérjék gélbe történő belépését és a jobb elválasztást gradiens gél alkalmazásával segítettük elő. A néglépéses extrakció eredményeként több mint 1000 különböző fehérjét sikerült azonosítani. A fehérjekivonás - a szövetdarabok intaktsága miatt - hatékonyabb volt, ha darabolt mintákat használtunk folyékony nitrogénben történő porítás

helyett,. Jelentős volt az oldékonyságbeli különbség is: az azonosított fehérjék több, mint 50%-a a négy extrakciós puffer közül kizárólag ez egyik pufferben volt kimutatható.

Optimalizált módszerünk alkalmas a bőrből történő fehérjekivonásra, az intra- és extracelluláris fehérjék széles spektrumú azonosítására, ezáltal összetett bőrbetegségek fehérje szintű elváltozásainak széleskörű tanulmányozására.