

*X. Erdélyi Tudományos Diákköri Konferencia
Kolozsvár, 2007*

**Lamellocita antigének azonosítása és molekuláris
jellemzése ecetmuslicában (*Drosophila melanogaster*)**

Szerző:
Csorba Kinga¹

Témavezetők:
Dr. Andó István², Dr. Kurucz Éva²

¹) Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Biológia-Geológia kar, Sejtbiológia és Molekuláris Biotekhnológia szak, mesterképzés

²) MTA, Szegedi Biológiai Központ, Genetika Intézet, Immunológia csoport

Tartalomjegyzék

1. Kivonat	2
2. Bevezetés	3
3. Célkitűzések	4
4. Anyagok és módszerek	5
4.1. <i>Drosophila melanogaster</i> állomány	5
4.2. Vérsejt kivonat készítése	5
4.3. Antigének immunprecipitációja	6
4.4. Western blot analízis	6
4.5. Dot blot analízis	6
4.6. Immunhisztokémia	
4.7. Indirekt immunfluoreszcencia és fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat	7
4.8. FACS analízis	7
5. Eredmények és megvitatásuk.	8
5.1. L2 lamellocita-specifikus antigén azonosítása.	8
5.2. L2 lamellocita-specifikus antigen biokémiai jellemzése	9
5.3. L6 lamellocita-specifikus antigén azonosítása	10
6. Következtetések	11
7. Irodalomjegyzék	12
Rövidítések	
Köszönetnyilvánítás	

1. Kivonat

Lamellocita antigének azonosítása és molekuláris jellemzése ecetmuslicában (*Drosophila melanogaster*)

Csorba Kinga, BBTE, BGK, Sejtbiológia és Molekuláris Biotechnológia szak, I. év

Témavezetők:

Dr. Andó István tudományos tanácsadó, MTA, SZBK, Genetika Intézet

Dr. Kurucz Éva tudományos munkatárs, MTA, SZBK, Genetika Intézet

Az ecetmuslica veleszületett immunrendszerének összetevői közé sejtes elemek és humorális faktorok tartoznak. A sejtes immunitás végrehajtó elemei a vérsejtek, melyeket molekuláris markerek segítségével három működésbeli csoportba soroltunk: plazmatociták, lamellociták és kristálysejtek.

A vérsejtek által közvetített sejtes immunválasz során a nem fagocitálható méretű, nem sajátként felismert anyagok előidéznek a lamellociták képződését amelyek tokot képeznek a betolakodó köré. A folyamat végeredménye az idegen test elpusztítása és környezetétől való elhatárolása. Ezen immunológiai folyamathoz kapcsolt sejtes reakcióra jellemző molekuláris mechanizmus megfejtése érdekében újabb lamellocitákra jellemző antigéneket (L2 és L6) azonosítottunk.

Az L2 antigén Western blot analízise egy 20, 55 és 110 kDa fehérjét eredményezett. Immunprecipitációs eljárással elkülönítettük az antigént, ezüstoffestéssel láthatóvá tettük és a megfelelő kivágott sávokat tömegspektrometriás vizsgálatra továbbítottuk. A triptikus peptid szekvencia alapján a fehérjét kodoló gén azonosítására törekszünk.

Az L6 antigén esetében hasonló megközelítést alkalmazunk.

2. Bevezetés

A rovarok a fajok számát és változatosságát tekintve az élővilág legsikeresebb tagjai; szárazföldi és vízi élőhelyeken is széleskörűen elterjedtek. A rovarok a kórokozókkal szemben hatékony, humorális és sejtes elemekből álló természetes immunrendszerrel védekeznek. A humorális immunválaszhoz tartozik a fertőzések által kiváltott antimikrobiális peptidek termelése, amelynek genetikai szabályozása és folyamata jól ismert. A humorális válasz nem rendelkezik a gerincesek ellenanyagaihoz hasonló specifitással és memóriával, viszont szabályozásának egyes elemei szinte az egész élővilágban azonos szerepet töltenek be. A sejtes immunválasz legősibb folyamata, a bekebelezés, az egysejtű szervezetektől a rovarokon keresztül a gerincesekig minden állati szervezetben a védekező reakciók részét képezi. A molekuláris genetika eszköztára a *Drosophila* genom megismerésével kombinálva egyedi lehetőségeket kínál; nemcsak in vitro, hanem in vivo körülmények között is lehetővé válik a veleszületett immunitás komplex genetikai, genomikai analízise.

Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) veleszületett immunrendszerének összetevői közé sejtes elemek és humorális faktorok tartoznak (Lavine és Strand, 2002). A sejtes immunitás végrehajtó elemei a vérsejtek vagy hemociták, melyeket molekuláris markerek segítségével három működésbeli csoportba sorolnak (Kurucz és mts. 2003, Vilmos és mts. 2004).

A plazmatociták alkotják a hemolimfában keringő sejtes elemek nagy részét. Kicsi, gömbölyded sejtek, melyek mikroorganizmusokat, apoptotikus sejteket bekebelező valamint antimikrobiális peptideket termelő képességgel rendelkeznek. A kristálysejtek, morfológiai és méretbeli szempontból a plazmatocitákhoz hasonlítanak. Sajátosságuk a citoplazmájukban levő, profeniloxidázt tartalmazó kristályszerű zárványok jelenléte. A sebek és idegen testek melanizációjában kitüntetett szerepet játsznak. A harmadik sejtípushoz a lamellociták tartoznak. Szerepük a tokképző folyamatban nyilvánul meg, amely során a plazmatocitákkal együtt több rétegben burkolják be a nem bekebelezhető, nagyméretű, idegenként felismert testeket.

A lamellociták egészséges, nem fertőzött vad típusú lárvákban csak közvetlenül a bábozódást megelőzően jelennek meg, alacsony számban; azonban immunológiai ingereket, mint például

a steril sebzést (Márkus és mts., 2005) vagy parazitoid fürkészdarázsak fertőzését követően magas számban jelennek meg a lárvális keringésben.

Az *l(3)mbn-1* „daganatgátló” mutáns törzsből a lamellociták a lárvális fejlődés során magas számban vannak jelen a hemolimfában.

A lamellocitákon több antigént azonosítottak. Ezek az antigének a lamellociták differenciálódása során szekvenciálisan jelennek meg. Az L1 és az L2 antigén először kis, plazmatocitaszerű sejteken jelenik meg, majd ezek az L1+, L2+ sejtek nagy, lemezszerű lamellocitává differenciálódnak. A terminális differenciálódás komplex folyamata, azaz a kis kerek sejtekből a testidegen részecskéket beborítani képes nagy, lemezes sejtekké történő átalakulás az antigénmintázat változásaival is jellemezhető. A kis kerek sejteken megjelenik az L4 antigén, majd a terminálisan differenciálódott sejteken az L6 antigén. A folyamat a sejtíváz átrendeződésével jár, melyben szerepet játszik egy aktin-kötő fehérje, a filamin, hemocitákban az L5 antigénként azonosított új, magas izoformájú változata (Rus és mts., 2006).

3. Célkitűzések

A gerincesek veleszületett immunitásának elemei részt vesznek a szerzett immunitás kialakulásában. Az elmúlt évszázadban a figyelem elsősorban a szerzett immunitás megismerésére összpontosult, és csak a századforduló környékén kezdődött el a veleszületett immunitás folyamatának részletesebb vizsgálata. A *Drosophila* teljes genomjának szekvenálása óta a muslica elsődleges helyet foglal el a veleszületett immunitás tanulmányozásában.

Munkánk célja elsődlegesen a sejtív immunválasz jellemzése, ezen belül egyes vérsejttípusok szerepének pontosabb vizsgálata. Ahhoz hogy megismerjük a lamellociták működését, jellemezni szeretnénk az L2 és L6 lamellocita specifikus markereket kódoló géneket, és ezek géntermékeit. A cél megvalósítása érdekében az L2 és L6 antigéneket felismerő monoklonális ellenanyagok segítségével a fordított genetika módszereit alkalmaztuk.

4. Anyagok és módszerek

4.1. *Drosophila melanogaster* állomány. Az ecetmuslicákat kukoricakorpás-élesztős táptalajon tenyésztettük, állandó 25°C-on. Kísérleteinkben az *l(3)mbn-1* daganat képződést elnyomó mutáns törzset használtuk, melynek jellegzetességei a megnövekedett nyirokmirigy és a keringésben levő vérsejtek daganatos osztódása (Konrad és mts. 1994).

4.2. Vérsejt kivonat készítése.

I. Harmadik stádiumos lárvák vérsejtjeit véreztetéssel, *Drosophila* Ringer oldatban (111mM NaCl / 1.87mM KCl / 2.38 mM NaHCO₃ / 1.1 mM CaCl₂ / 0.84mM NaH₂PO₄) gyűjtöttük össze, jégen. A centrifugálás (240 g, 8 perc, 4°C) után a sejteket lízis által roncsoltuk 4°C-on 1 órán keresztül. A lízis puffert (50 mM Tris-HCl, pH 8.0 / 150 mM NaCl / 0.5% Nonidet P-40 / 0.2% sodium deoxycholate / 0.1% SDS) proteáz aktivitást gátló koktéllal, fenil-metil-szulfonil-fluoriddal (PMSF) és 0.5 M jód-acetammiddal egészítettük ki. Az újabb centrifugálást (12.000 g, 15 perc, 4°C) a felülúszó dot blot analízise, Western blot analízise vagy immunoprecipitáció utáni Western blot analízise követte.

II. Teljes sejt kivonatot lárvák *Drosophila* Ringer oldatba történő véreztetése által készítettünk. Centrifugálás után (240 g, 8 perc, 4°C) a leülepedett sejtömeget 2 térfogat SDS-PAGE mintapufferben feloldottuk és 5-ször 10 másodpercet szonikáltuk MSE 5-70 típusú ultrahangos sejtporlasztóval (szonikátor).

III. Nonidet P-40 alapú frakcionálás: 10⁷ számú vérsejtet ülepités után feloldottunk 70 µl Nonidet P-40 (NP-40) alacsony só-koncentrációjú pufferben (50 mM Tris-HCl, pH 8.0 / 50 mM NaCl / 1% Nonidet P-40 / proteáz aktivitást gátló koktél, PMSF és 0.5 M jód-acetamid), melyben 10 percig jégen inkubáltuk, végül homogenizáltuk Dounce homogenizátorral. A citolapmatikus és sejtmagi frakciót centrifugálással (7.000 g, 15 perc, 4°C) választottuk szét.

IV. Dignam frakcionálás: 10⁷ számú vérsejtet ülepités után feloldottunk 75 µl A pufferben (10 mM HEPES, pH 8.0 / 1.5 mM MgCl₂ / 10 mM KCl / proteáz aktivitást gátló koktél, PMSF és 0.5 M jód-acetamid) melyben 15 percig jégen inkubáltuk a sejteket. A sejteket egy 26-os méretű tűhöz csatlakoztatott fecskendőn keresztüli 10-szeres átpaszírozással roncsoltuk. A

citoplazmatikus és sejtmagi frakciót centrifugálással (12.000 g, 1 perc, 4°C) választottuk szét. A mintákat dot blot analízissel ellenőriztük.

4.3. Antigének immunprecipitációja. Három ml hibridoma felülúszót (tartalmazza a monoklonális ellenanyagot) 50 µl 20%-os G-fehérje sepharózhhoz adagoltunk és 1 órán keresztül szobahőmérsékleten forgattuk. A lépést háromszor megismételtük. Miután a G-fehérje sepharóz/antitest komplexet háromszor 5 ml 0.2 M-os, pH 9.0 Borát pufferrel mostuk, az antitestet dimetil-pimelimidát (0.52 mg DMP / 100 µl 0.2 M, pH 9.0 Borát puffer) segítségével kovalensen a G-fehérje sepharózhhoz kötöttük. A reakciót, a komplexek 5 ml 0.2 M-os, pH 8.0 etanolaminos mosásával állítottuk le. Ezt a lépést háromszor ismételtünk. Az utolsó mosásnál 2 órán keresztül hagytuk a komplexeket etanolaminban szobahőmérsékleten forogni. PBS-ben történő végső mosás után a sejtkivonatot a G-fehérje sepharóz/antitest komplexekkel összevontuk. Az immunprecipitáció 4°C-on, éjszakán át történt.

Végül az immunprecipitátumot 3-szor lízis pufferrel mostuk, majd 5 percig redukáló vagy nem redukáló SDS-PAGE mintapufferben főztük. A mintákat SDS-gélelektroforézist követően ezüstfestéssel és Western blot analízissel vizsgáltuk.

4.4. Western blot analízis. A kivonatok fehérjéit gélen molekulásúlyuk alapján választottuk el SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel (SDS-PAGE). Elektroforézist követően a fehérjéket PVDF membránra (Millipore) vittük át metanolos transzfer pufferben (25 mM Tris, / 192 mM glycine / 20% methanol) A membránt 5%-ban tejport és 0,1%-ban Tween-20-at tartalmazó TBS pufferbe (0.1 M Tris, pH 7.5 / 0.5 M NaCl) blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten (a nem specifikus kötőhelyek elfedése érdekében). A hibridoma felülúszót és a fehérjéket tartalmazó membránt 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten, állandó rázatás mellett inkubáltuk. A membránt TBS-TW pufferrel való mosása után HRPO-konjugált anti-egér antitesttel (Amersham Biosciences) 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten, állandó rázatás mellett inkubáltuk. TBS-TW-es és TBS-es mosás után a fehérjéket ECL-Plus rendszer (Amersham Biosciences) segítségével hívtuk elő Röntgen-filmre.

4.5. Dot blot analízis. Öt µl sejt kivonatot PVDF membránra csepegtettünk és 5%-ban tejport és 0,1%-ban Tween-20-at tartalmazó TBS pufferben (0.1 M Tris, pH 7.5 / 0.5 M NaCl)

blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. A hibridoma felülűszót és a fehérjéket tartalmazó membránt 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten, állandó rázatás mellett inkubáltuk. A membránt TBS-TW pufferrel való mosása után HRPO-konjugált anti-egér antitesttel (Amersham Biosciences) 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten, állandó rázatás mellett inkubáltuk. TBS-TW-es és TBS-es mosás után a fehérjék láthatóvá tétele Röntgen filmre az ECL-Plus rendszer (Amersham Biosciences) segítségével történt.

4.6. Immunhisztokémia. Harminc μ l *Drosophila* Ringerben szuszpendált vérsejtet tárgylemezre (Hendley- Essex Loughton, U.K.) cseppentettünk. Nedves kamrában, szobahőmérsékleten 45 percig tapasztottuk a vérsejteket. Acetonos fixálás után rehidratáltuk a mintákat és blokkoltuk a nem-specifikus fehérje kölcsönhatásokat 0.1% BSA-PBS pufferrel. A mintákat az elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk 1 órát, majd mostuk PBS-el. A másodlagos ellenanyag a biotinált anti-egér immunglobulin volt. Az antigén-antitest komplexekhez streptavidin-HRPO-t cseppentettünk, amelyhez 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) kromogén terméket (szubsztrát) adtunk.

4.7. Indirekt immunfluoreszcencia és fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat. *Drosophila* Ringerben szuszpendált vérsejteket tárgylemezre (Hendley- Essex Loughton, U.K.) cseppentettünk. A sejtek 45 perc alatt nedves kamrában, szobahőmérsékleten kitapadtak. Acetonos fixálás után rehidratáltuk és egyben blokkoltuk a nem-specifikus fehérje kölcsönhatásokat 0.1% BSA-PBS pufferrel. A mintákat az elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk 1 órát, majd mostuk őket PBS-el. A kialakult antigén-antitest komplexekhez FITC-el jelölt anti-egér Ig-t cseppentettünk, majd a mintákat Axioskop fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

4.8. FACS analízis. 2×10^5 sejtet helyeztünk 96 lyukú lemez U-alakú üregeibe. Mindegyik üregbe 100 μ l hibridoma felülűszót tettünk és jégen inkubáltuk a sejteket 1 órát Jéghideg FACS pufferrel (0.5% BSA / 0.05% azid / PBS) történő mosás után, FITC-el jelölt anti-egér IgG antitesttel inkubáltuk a sejteket jégen 1 órán át.. (1:300 hígítás). FACS pufferrel történő történő mosást követően a sejteket FACSCalibur felszereléssel (Beckton Dickinson) vizsgáltuk.

A sejtek belsejében kifejeződő antigéneket 20 perces, 2%-os paraformaldehides fixálást követő, 5 perces, 0.1%-os Triton X-PBS pufferes permeabilizálás után észleltük.

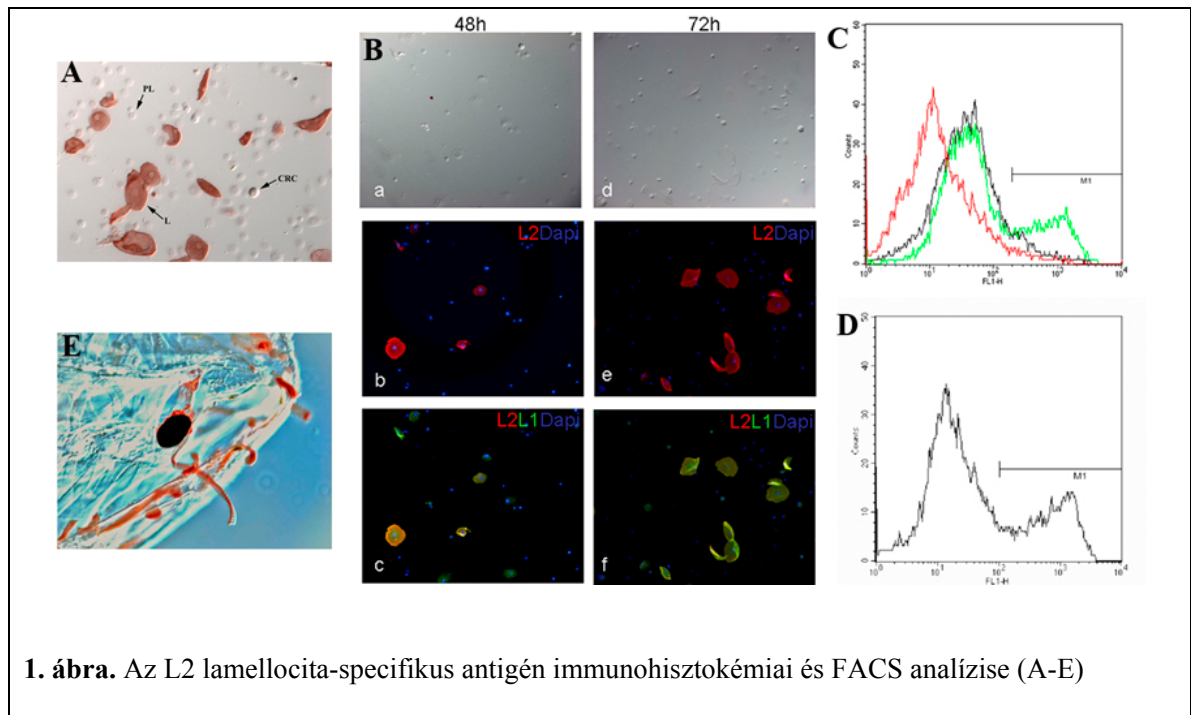
5. Eredmények és megvitatásuk

5.1. L2 lamellocita-specifikus antigén azonosítása. Az L2 antigént a 31A4 monoklonális ellenanyag ismeri fel. Az L2 molekula az *l(3)mbn-1*, véresejtet túltermelő mutáns lárvákban a keringő hemociták alpopulációján fejeződik ki. Az 1.A ábrán látható, hogy permeabilizált véresejtben acetonos kezelését követően az L2 molekula minden lamellocitában megjelenik, viszont hiányzik a plazmatocitákban és kristálysejtben.

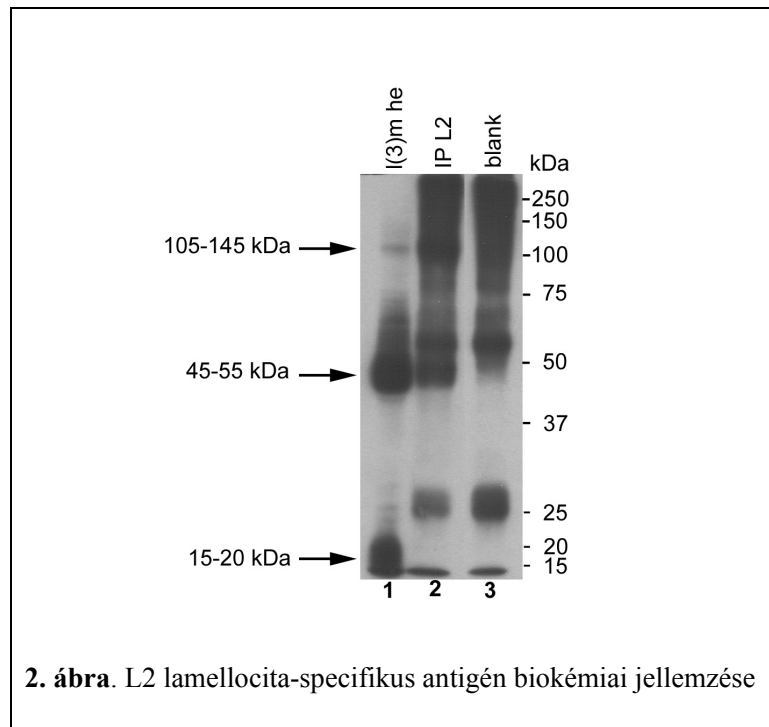
Az Oregon-R, vad típusú, késői harmadik stádiumú lárvákban nagyon kevés lamellocita található, viszont parazitoid darázs által okozott fertőzést követően erőteljes lamellocita differenciálódás figyelhető meg. Lamellocita képződést idéztünk elő második stádiumú Oregon-R lárvákban *Leptopilina bouvardi* fürkészdarázs általi szúrattal. Fertőzés után 48 órával az újonnan képződött lamellocitákban megfigyeltük az L2 antigén kifejeződését (1.Bb ábra), habár a kifejeződés csak egy lamellocita alcsoportra korlátozódott. Az utóbbi megfigyelést kettős festés alkalmazásával mutattuk ki, egy minden lamellocitán jelenlévő L1 antigén segítségével (Kurucz és mts. 2003) (1.Bc ábra). Fertőzés után 72 órával az L2 antigén minden újonnan képződött lamellocitán kifejeződött (1.Be,f ábra). A fentiek alapján kijelenthetjük, hogy a lamellocita differenciálódása során az L1 és L2 antigének szekvenciálisan jelennek meg.

FACS analízis során az élő (1.C ábra, piros) és paraformaldehiddel fixált (1.C ábra, fekete) *l(3)mbn-1* lárvális véresejteken az anti-L2 ellenanyag nem képezett komplexet az L2 antigénnel. TritonX-100-al való permeabilizálás után a keringő véresejt 25%-án látható volt az L2 kifejeződése (1.C ábra, zöld), ami megfelel az L1 pozitív lamellocitáknak (1.D ábra). Az eredmények bizonyítják hogy az L2 antigén a lamellocita sejtmembránjának belső felületén vagy a citoplazmában fejeződik ki.

Az L2 molekulát a parazitoid fürkészdarázs petéje körüli tokképzésben résztvevő lamellociták is kifejezik. Immunohisztokémiával kimutattuk az L2 molekulát expresszáló lamellocitákat a parazitoid pete körül (1. E ábra).



5.2. L2 lamellocita-specifikus antigén biokémiai jellemzése. Az *l(3)mbn-1* mutáns törzs lárvális vérsajt kivonatának redukáló körülmények között történő Western blot analízise három jelet mutatott ki a 15-20, 45-55 és 105-145 kDa-os molekula súlyú tartományban (2. ábra, 1 sáv). Immunprecipitációval és 31A4 monoklonális antitest segítségével izoláltuk az L2 antigént (2. ábra, 2 sáv). Az L2 molekulának megfelelő ezüsfestett fehérjesávot kivágtuk és MALDI- TOF analízisre továbbítottuk. A triptikus peptid szekvencia alapján a fehérjét kódoló gén azonosítása következik.

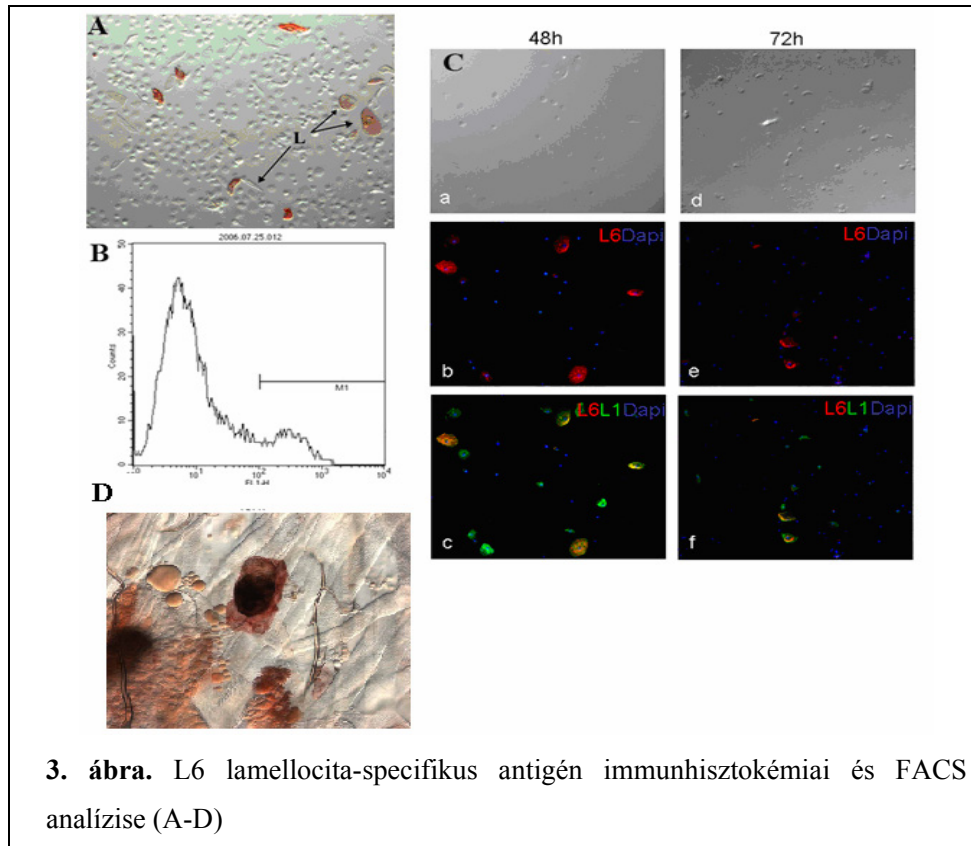


5.3. L6 lamellocita-specifikus antigén azonosítása. Az L6 antigént a H3/E4 monoklonális ellenanyag határozza meg. Az L6 molekula az *l(3)mbn-1*, véresejt túltermelő mutáns lárvákban a lamellocita populáció egy alcsoportján fejeződik ki (3.A ábra). Az L6 molekula egy transzmembrán receptor típusú fehérje.

Az L6 antigént a parazitoid fürkészdarázs pete körüli tokképzésben résztvevő lamellociták is kifejezik (3.D ábra).

FACS analízis során kiderült, hogy az élő *l(3)mbn-1* lárvális véresejtek 13 %-án látható az L6 antigén kifejeződése (3.B ábra). A vad típusú Oregon-R lárvák parazitoiddal történő fertőzése után 48 órával az L6 antigén kifejeződése egy lamellocita alcsoportra korlátozódott, amit kettős festés alkalmazásával mutattunk ki, egy minden lamellocitán jelenlévő L1 antigén segítségével (3.C b-c ábra). Fertőzés után 72 órával az L6 antigén állandó jelleggel egy terminálisan differenciálódott lamellocita alcsoporton expresszálódik. A fentiek alapján kijelenthetjük, hogy a lamellocita differenciálódást az L1, L2 és L6 antigének szekvenciális kifejeződése kíséri.

Különböző módon készített véresejt kivonatok dot blot analízisét végeztük el, sikeres eredmény nélkül. Feltételezzük, hogy a H3/E4 ellenanyag az L6 antigén egy konformáció függő epitopját ismeri fel, a mely a különböző detergenset használó eljárások során megsérül.



6. Következtetések

1. Eddig nem ismert lamellocita sejtmembrán belső felszínén vagy citoplazmában (L2), illetve lamellocita alsóport membránjában (L6) kifejeződő antigéneket azonosítottunk.
2. A lamellocita differenciálódást az antigének szekvenciális kifejeződése kíséri.
3. Az L2 antigén esetében egy 15-20 kDa, 45-55 és 105-145 kDa-os fehérjét mutattunk ki, melynek ezüsfestett csíkjait gélből kivágtuk és tömegspektrometriás vizsgálatra továbbítottuk. A triptikus peptid szekvencia alapján a fehérjét kodoló gén azonosítása következik. Az azonosított gén vizsgálata alapján meghatározhatjuk a molekula szerepét a sejtes immunválasz szabályozásában.
4. Az L6 antigén estében munkálatok folynak a fehérje izolálása érdekében.

7. Irodalomjegyzék

Lavine, M.D., Strand, M.R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1295–1309.

Kurucz, E., Zettervall, C-J., Sinka, R., Vilmos, P., Pivarcsi, A., Ekengren, S., Hegedüs, Z., Ando, I., and Hultmark, D. (2003). Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 2622–2627.

Vilmos, P., Nagy, I., Kurucz, É., Hultmark, D., Gateff, E., and Andó, I. (2004). A rapid rosetting method for separation of hemocyte sub-populations of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 555-563.

Márkus, R., Kurucz, É., Rus, F., Andó, I. (2005). Sterile wounding is a minimal and sufficient trigger for a cellular immune response in *Drosophila melanogaster*. *Immunol Lett.* 101(1),108-111.

Rus, F., Kurucz, É., Márkus, R., Sinenko SA., Laurinyecz, B., Pataki, Cs., Gausz, J., Hegedüs, Z., Udvardy, A., Hultmark, D., Andó, I. (2006). Expression pattern of Flamin-240 in *Drosophila* blood cells. *Gene Expr. Patterns.* 6(8):928-34

Konrad, L., Becker, G., Schmidt, A., Klockner, T., Kaufer-Stillger, G., Dreschers, S., Edstrom, J. E, and Gateff, E. (1994). Cloning, structure, cellular localization, and possible function of the tumor suppressor gene lethal(3)malignant blood neoplasm-1 of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 163, 98-111.

Rövidítések:

AEC	3-amino-9-ethylcarbasole
BSA	Bovine Serum Albumin
ECL	Enhanced Electrochemiluminescence
FACS	Fluorescence-Activated Cell-Sorting
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
HRPO	Horse Radish Peroxidase
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption-Time Of Flight
PBS	Phosphate Buffered Saline
PVDF	Polyvinylidene Fluoride-Immobilon™-P
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis
TBS	Tris Buffered Saline

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Andó Istvánnak és Dr. Kurucz Évának hasznos tudományos tanácsaikért, irányításukért és azért, hogy lehetőséget adtak arra, hogy csoportjukban dolgozzam. További hálás köszönet Laurinyecz Barbarának, Dr. Márkus Róbertnek, Váczi Balázsnak, Zsámboki Jánosnak, Kovalcsik Olgának és Tápai Szilviának.