

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar

HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont,
Lendület Glikán Biomarker Kutatócsoport

OTDK Dolgozat

Alternatív proteomikai mintaelőkészítési módszerek különböző eredetű biológiai minták vizsgálatához

Készítette: **Molnár Alexandra**

Témavezetők: **Dr. Turiák Lilla**, tudományos főmunkatárs

HUN-REN TTK, Lendület Glikán Biomarker Kutatócsoport

Balbisi Mirjam, tudományos segédmunkatárs

HUN-REN TTK, Lendület Glikán Biomarker Kutatócsoport

Belső konzulens: **Dr. Horváth Viola**, egyetemi docens

BME VBK, Szervetlen és Analitikai Kémia tanszék

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	2
1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Proteomika egykor és most.....	5
2.2. Proteomikai mintaelőkészítések.....	6
2.2.1. Proteomikai megközelítések.....	7
2.2.2. Mintaelőkészítés „bottom-up” proteomikához	8
2.2.3. Szilárd fázisú extrakciós tisztítási módszerek.....	10
2.2.4. Alternatív mintaelőkészítési módszerek	11
2.3. Kromatográfiai módszerek.....	16
2.4. Tömegspektrometriai mérések.....	18
2.4.1. Tömegspektrometriai adatgyűjtési módszerek.....	20
2.5. Proteomikai mérési eredmények értékelése, fehérjeazonosítás	21
3. Célkitűzés.....	24
4. Felhasznált anyagok és módszerek.....	25
4.1. Felhasznált anyagok.....	25
4.2. Alkalmazott módszerek.....	25
4.2.1. Mintaelőkészítés oldatban történő tripszines emésztéssel a C ₁₈ , SP2 és SPx tisztításokhoz (plazma- és membránminták)	25
4.2.2. Szövetfelületi emésztések (szövetminták)	26
4.2.3. Mintaelőkészítés etanolos kicsapással (referencia lizátumminták).....	27
4.2.4. Paramágneses gyöngyök előkészítése	27
4.2.5. Mintaelőkészítés az SP3, SP4 és SPy módszerekkel.....	28
4.2.6. Peptidek tisztítása C ₁₈ módszerrel	29
4.2.7. Peptidek tisztítása SP2 és SPx módszerekkel	29
4.2.8. Műszeres analitikai vizsgálatok.....	30
4.2.8.1. nano-UHPLC elválasztás paraméterei.....	30
4.2.8.2. Tandem MS mérés	30
4.2.9. Mérési eredmények kiértékelésének menete	31
5. Eredmények kiértékelése	32
5.1. Kromatogramok tisztaságának jellemzése.....	32
5.2. Összehasonlítás az azonosított peptidek és fehérjék száma alapján	36
5.3. Összehasonlítás relatív visszanyerés alapján.....	39
5.4. Összehasonlítás az azonosított peptidek izoelektromos pontja alapján.....	41
5.5. Összehasonlítás az azonosított peptidek hidrofilitása alapján.....	44
5.6. Összehasonlítás az azonosított peptidek hossza alapján.....	46
5.7. Az egyes módszerek általános értékelése.....	47
6. Összefoglalás	49
7. Irodalomjegyzék	51
8. Rövidítés jegyzék.....	56
9. Függelék	58

Köszönetnyilvánítás

Még az érdemi rész tárgyalása előtt szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik nélkül a dolgozatom ebben a formában nem jöhetett volna létre. Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Turiák Lillának a lehetőségért, hogy a kutatócsoportjában dolgozhatok. Külön köszönöm a dolgozathoz fűzött segítségét és rengeteg jótanácsát.

Hálával tartozom Balbisi Mirjamnak, hogy fáradhatatlanul segített a laboratóriumi betanulásom és a dolgozatom megírása során. Köszönöm, hogy az építő jellegű kritikái sosem voltak bántóak.

Külön köszönettel tartozom Dr. Virág Dávidnak, hogy az utolsó pillanatban is rengeteg jó ötlettel és tanáccsal látott el.

Köszönöm Dr. Horváth Violának, hogy vállalta a dolgozatommal kapcsolatos belső konzulensi feladatokat.

Végtelenül hálás vagyok a családomnak a tőlük kapott rengeteg szeretetért és türelemért. Külön köszönöm szüleimnek, hogy átolvasták a dolgozatomat, és segítettek az egyes elírások javításában.

1. Bevezetés

A proteomika a biológiai rendszerek teljes fehérjekészletének átfogó elemzésével és az ezt alkotó fehérjék különböző tulajdonságaival foglalkozó tudomány, melynek célja azok szerkezetének, funkcióinak és biológiai rendszerek irányításában betöltött szerepének vizsgálata.¹ A proteomikai technológiákat egyre elterjedtebben használják diagnosztikai markerek kimutatására, patogenitási mechanizmusok megismerésére és az eltérő betegségek funkcionális fehérjeútvonalainak értelmezésére.²

A sikeres proteomikai vizsgálatok kivitelezéséhez elengedhetetlen a teljes munkafolyamat optimalizálása. Ebbe beletartozik a megfelelő mintaelőkészítési módszer választása, a korszerű folyadékkromatográfiához (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) kapcsolt tömegspektrometriai (*Mass Spectrometry*, MS) módszerek alkalmazása és a nyers adatok kiértékeléséhez a megfelelő proteomikai szoftverek és adatbázisok használata. A Tudományos Diákköri Konferenciára készített dolgozatom elsősorban a mintaelőkészítési folyamat optimalizálásával foglalkozik.

A proteomikai mintaelőkészítéseknél általános probléma, hogy a széleskörben alkalmazott oldatban történő tripszines emésztés, majd C₁₈ oszlopon történő tisztítás összetett folyamat, mely rendkívül időigényes és jelentős mintavesztéssel járhat.³ Ezen hátrányok miatt szükséges olyan alternatív mintaelőkészítési protokollok keresése és fejlesztése, melyek ezen hiányosságok kiküszöbölésére alkalmasak. Ígéretes alternatívát nyújtanak az irodalomban található SP3 és SP2 paramágneses gyöngyök használatán és az SP4 oldószeres kicsapáson alapuló eljárások, melyek részben megoldást jelentenek a hagyományos mintaelőkészítés hátrányaira.⁴⁻⁶

Az alternatív eljárások közül a legnépszerűbb az SP3, azaz „egy-edényes, szilárd fázissal segített mintaelőkészítési módszer” (*Single-Pot, Solid-Phase-enhanced Sample Preparation*, SP3) egy könnyen kivitelezhető, jó reprodukálhatósággal és áteresztőképességgel rendelkező mintafeldolgozási protokoll, ami így megfelelő lehet az általános előkészítési módszer kiváltására.⁷ A „szilárd fázissal segített mintatisztítási módszer” (*Solid Phase-enhanced Sample Purification*, SP2) egy szisztematikusan kidolgozott eljárás, melyet kifejezetten peptidminták tisztítására fejlesztettek, így jó alternatívát jelenthet olyan minták C₁₈ oszlopon történő szilárd fázisú extrakciós tisztításának (*Solid Phase Extraction*, SPE) helyettesítésére, melyeknél nincsen lehetőség a minta sómentesítésére még az enzimatisztítás előtt.⁵ Az „egy-edényes, oldószeres kicsapással és szilárd fázissal segített mintaelőkészítési módszer” (*Solvent Precipitation*

Single-Pot, Solid-Phase-enhanced Sample Preparation, SP4) az SP3 módszer mellett egy másik lehetőség a fehérjeminták előkészítésére és tisztítására.⁴ Az SP4 protokoll előnye, hogy gyorsabban elvégezhető, mint az általánosan alkalmazott oldószeres kicsapással végzett mintaelőkészítések.

Az említett módszereknek azonban megvan a maguk hiányossága, hiszen míg az SP3 csak fehérjeminták, addig az SP2 kifejezetten csak peptidminták előkészítésére lett fejlesztve, továbbá az SP4 módszer eredményes alkalmazásához jellemzően nagyobb mintamennyiségek szükségesek. Ezek mellett a módszerek széleskörű, különböző eredetű biológiai mintákra való alkalmazhatóságáról még nem áll rendelkezésre ismeret.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Proteomika egykor és most

Az analitikai módszerek ugrásszerű fejlődésének köszönhetően jelentős változások következtek be a biokémiai és molekuláris biológiai kutatások szemléletében. Míg egykor főleg hipotézisek irányították a kutatásokat, később inkább a rendszerszintű vizsgálatok kezdték el jellemezni azokat, melyek a biológiai rendszerek alkotóelemeinek működéséről, tulajdonságairól és az egymással való kölcsönhatásairól adnak információt.¹

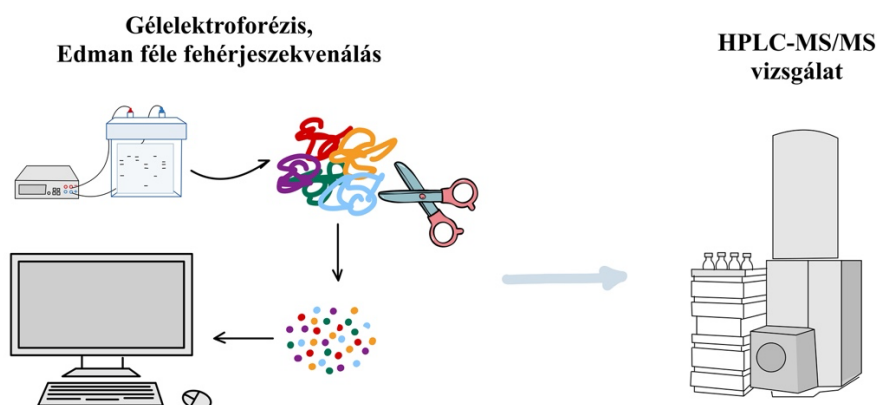
A fejlett műszeres analitikai módszerek megjelenése előtt a peptidek és fehérjék méretének meghatározására és azok elválasztására többféle fizikai módszert alkalmaztak. Néhány példa ezek közül a nátrium-dodecil-szulfát poli(akrilamid) gélelektroforézis (*Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE)⁸, a gélszűrés⁹ és a vékonyréteg kromatográfia¹⁰, melyeket később a folyadékkromatográfiás elválasztások^{11,12} váltottak fel. Az aminosavsorrend meghatározása régen az úgynevezett Edman-degradációval történt. Ennek a módszernek azonban nagy hátránya, hogy minden technológiai fejlődés ellenére rendkívül időigényes, így hamar átvette a szerepét a gyorsan fejlődő tömegspektrometria, ami a peptid fragmensek gyorsabb, pontosabb és érzékenyebb elemzését teszi lehetővé.^{13–16} Mindezen előnyök ellenére a proteomikában való széleskörű elterjedésük elsősorban a lágy ionizációs technológiák megjelenésének köszönhető.¹⁷

A proteomikában alkalmazott folyadékkromatográfiához kapcsolt tömegspektrometriás (HPLC-MS) mérések során a mérendő mintát a folyadékkromatográfba injektálják, ahol az analát alkotói eltérő erősségű kölcsönhatásokat alakítanak ki a kromatográfiás oszlop álló- illetve mozgófázisával, ennek köszönhetően a különböző tulajdonságú mintaalkotók elválnak. Ezután a mintafrakciók a tömegspektrométerbe jutnak, ahol a lágy ionizációnak köszönhetően főleg molekulaionok és kisebb számban fragmensionok képződnek belőlük. Az ionokat ezután az analizátor a tömeg/töltés értékük alapján szétválasztja, és a detektorba juttatja, ahol az azonos tömeg/töltéssel rendelkező ionok mennyiségi meghatározása történik. A kromatográfiás és tömegspektrometriás módszerekről a 2.3. és 2.4. fejezetekben található részletesebb leírás.

Mint minden módszernek, a tömegspektrometriás analíziseknek is megvannak a hátrányai, nehézségei. Egyes peptidek rosszabbul ionizálódnak és nehezen

fragmentálódnak, így ezek nem jelennek meg a spektrumban, valamint a proteomika folyamatosan változó biológiai rendszereket vizsgál, emiatt pedig sok esetben nem homogén a rendelkezésre álló minta.¹

A proteomikai mérések után a következő lépés az adatok kiértékelése. Míg régen ez manuálisan történt és emiatt sok időt igényelt, ma már rendkívül sok szoftver és statisztikai módszer áll a kutatók rendelkezésére a feladatok megoldásához.



1. ábra: Fehérje azonosítási módszerek egykor (gélelektroforézis, Edman féle fehérjeszekvenálás) és most (HPLC-MS/MS vizsgálat)

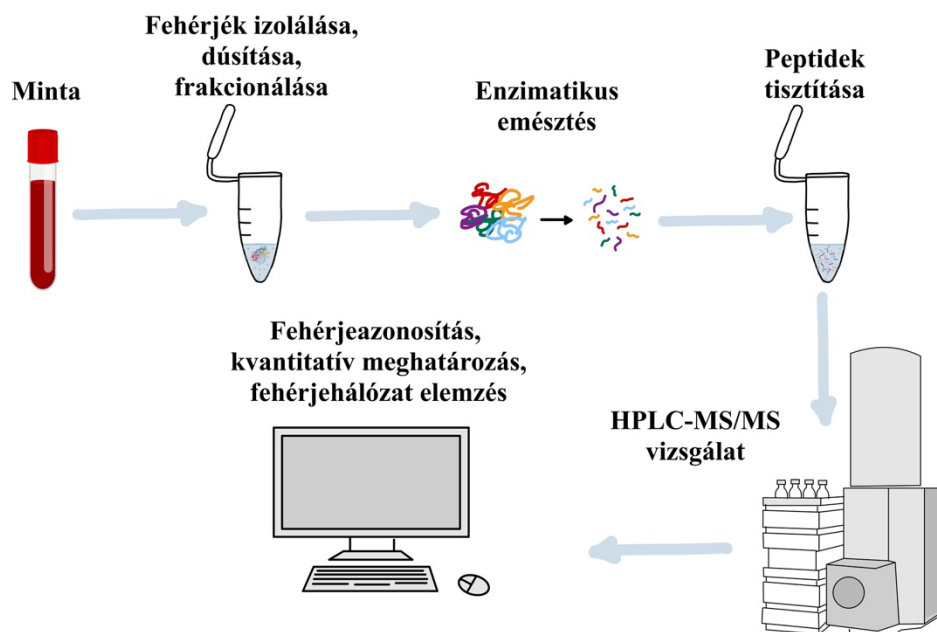
A tömegspektrometria számtalan előnnyel rendelkezik a klasszikus proteomikai módszerekhez képest. Az MS mérésekhez akár zeptomolnyi mintamennyiségek is elegendőek, melyből gyorsan nagyszámú fehérje azonosítása és mennyiségi meghatározása is lehetséges.^{18–20} Napjainkban a tömegspektrometria alapú proteomikát széleskörűen alkalmazzák biológiai alapkutatásokban^{21–23}, orvosi diagnosztikában^{24–26}, gyógyszergyártásban²⁷ és a korszerű mezőgazdaságban²⁸ a különböző eredetű biológiai minták, mint például vérplazma²⁹, sejtizátum³⁰, szövet^{21,31}, gerincvelői folyadék³² és nyál³³, de akár növényi minták³⁴ vizsgálatára is.

2.2. Proteomikai mintaelőkészítések

A proteomikai minták általában komplex biológiai rendszerekből származnak, és azokból kell egy szennyezőktől megtisztított fehérje vagy peptidoldatot készíteni. Ennek megvalósításához különböző mintaelőkészítési módszerek állnak rendelkezésre.^{2,4–7,21,35–39} A mintaelőkészítési módszerekkel szemben támasztott általános elvárások, hogy azok standardizáltak, megbízhatók és reprodukálhatók legyenek, valamint lehetőleg minél kevesebb lépést tartsanak magukban.¹

2.2.1. Proteomikai megközelítések

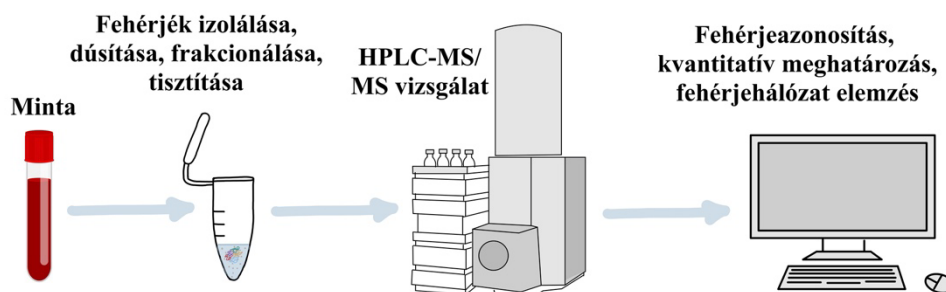
Mielőtt a mintaelőkészítési folyamatokról részletesebben is szó esne, ismertetem a különböző proteomikai megközelítések típusait, mivel ezek nagymértékben határozzák meg, hogy milyen mintaelőkészítési lépések szükségesek, továbbá befolyásolják a méréshez szükséges készülékkel szemben támasztott követelményeket.¹



2. ábra: "Bottom-up" proteomikai megközelítés

A legelterjedtebb megközelítés az úgynevezett „*bottom-up*” stratégia⁴⁰, mely esetében peptidek elemzése történik a HPLC-MS/MS mérés során. Ehhez először enzimatikus úton peptidekké kell emésztetni a fehérjemintát. Az emésztéshez endopeptidáz enzimeket használnak (pl.: tripszin, LysC), amelyek minden esetben jellegzetes aminosavak mellett hasítanak, viszonylag kisméretű (500-3000 Da) peptideket eredményezve.⁴¹ A kisméretű peptidek már könnyen elválaszthatók folyadékkromatográfiával. Az elválasztást MS/MS mérés követi, mely során a peptidek fragmentációjából keletkező fragmensek tömeg/töltés (m/z) értékének meghatározása történik, majd ezekből szoftveres segítséggel lehetséges a peptid aminosavsorrendjének meghatározása. Szintén szoftveres úton lehet következtetni arra, hogy az adott fehérjéket milyen mennyiségben tartalmazza a minta. A „*bottom-up*” módszer legnagyobb előnye, hogy kiemelkedően jó az érzékenysége, azonban az eljárás jelentős hátrányai, hogy a peptidek sok esetben nem rendelhetők egyértelműen egy fehérjéhez, és sokszor elvesznek a poszttranszlációs módosulásokhoz tartozó információk. A poszttranszlációs módosulások vizsgálata azért

fontos, mert ezek módosíthatják a fehérjék egyes tulajdonságait például az aktivitását, lokalizációját és más fehérjékkel kialakított kölcsönhatásait, ebből pedig a szervezet különböző változásaira lehet következtetni.⁴²



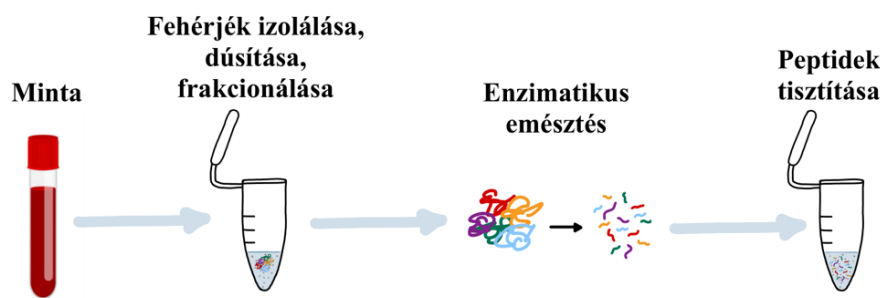
3. ábra: "Top-down" proteomikai megközelítés

A „*top-down*” stratégia⁴³ az intakt fehérjék vizsgálatával foglalkozik, melynek legnagyobb különbsége az előbbi „*bottom-up*” módszerhez képest, hogy a fehérjéket mintából való izolálásuk után közvetlenül LC-MS módszerrel méri, és így azonosítják azokat. Előnye, hogy lehetséges vele egymáshoz nagyon hasonló szerkezetű fehérjék megkülönböztetése és a poszttranszlációs módosulások részletes jellemzése. Hátrányai viszont, hogy komplex mintákra csak korlátozottan használható, elsősorban egy-egy fehérje jellemzésére alkalmas és drágább műszerezést igényel.

Az előbbieket mellett létezik egy harmadik módszer is, mely a közelmúltban vált egyre elterjedtebbé, ez a „*middle-down*” eljárás.⁴⁴ A „*bottom-up*” stratégiához hasonlóan ebben az esetben is használnak emésztőenzimeket, azonban ezek hosszabb peptidekké hasítják a fehérjéket. Az így keletkező hosszabb, specifikusabb peptideknek köszönhetően sok esetben könnyebb a fehérjék azonosítása, valamint jobban vizsgálhatók vele a poszttranszlációs módosítások, amelyek a „*bottom-up*” módszerrel vizsgált rövidebb peptidekből alkotott komplex keverék miatt nem kerülnének detektálásra.

2.2.2. Mintaelőkészítés „*bottom-up*” proteomikához

Mivel kutatásom során a „*bottom-up*” munkafolyamatot alkalmaztam, ezért az ehhez a módszerhez tartozó mintaelőkészítési protokollt fogom részletesebben ismertetni. A különböző biológiai minták előkészítései eltérő kihívásokat rejtenek magukban^{45,46}, ezért az általam bemutatott módszer néhány lépése eltérhet például sejtkultúra⁴⁷ vagy szövetminták²¹ esetében.



4. ábra: Mintaelőkészítés a "bottom-up" proteomikai megközelítéshez

A mintaelőkészítés első lépése a fehérjék kinyerése a biológiai mátrixból, és azok oldhatóvá tétele. Ez a folyamat az eltérő biológiai minták esetében más és más módszerekkel történhet, például sejtek esetén fagyasztás-olvasztás ciklusokkal⁴⁸, vagy lízispufferben történő szonikálással.⁴⁹ A mintaelőkészítés során szükség lehet különböző adalékanyagok hozzáadására, ezeket és funkcióikat az 1. táblázat mutatja be.

1. táblázat: Mintaelőkészítés során alkalmazott adalékanyagok

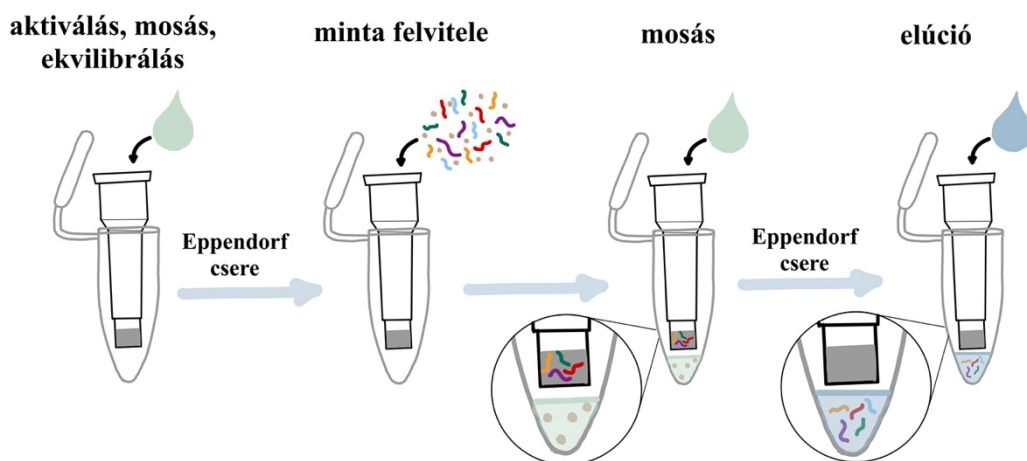
Additív	Funkció
Kaotróp	A nem-kovalens kölcsönhatásokat befolyásolva növeli a fehérjék vízoldhatóságát
Detergens	Oldhatóvá teszi a membrán fehérjéket
Redukálószer	Redukálja a diszulfid hidakat
Alkilálószer	Megakadályozza a diszulfidhidak visszaalakulását
Denaturálószer	Széttekeri a globuláris fehérjéket, megakadályozzák a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat
Proteáz inhibitor	Gátolja vagy inaktiválja a szubcelluláris kompartmenekből felszabaduló proteolitikus enzimeket

Ezen additívek hozzáadása azonban gátolhatja a tripszin működését, valamint némelyikük nem MS kompatibilis.¹ Ezért a fehérjék oldhatóvá tétele után az enzimatiskus emésztés előtt egy tisztítási lépés beiktatására lehet szükség, majd az emésztéshez megfelelő kémhatás elérése érdekében megfelelő puffereket (pl.: ammónium-bikarbonát) adnak a rendszerhez. A fehérjék peptidekké való emésztéséhez komplex minták esetében általában a lizin és arginin aminosavaknál hasító tripszint alkalmazzák, melynek előnyei, hogy magas a proteolitikus aktivitása, kevésbé érzékeny a kísérleti körülményekre, és tipikusan 500-3000 Da méretű peptideket képez, amelyek ideálisak a

tömegspektrometriás mérésekhez.⁴¹ Fontos azonban megjegyezni, hogy a különböző enzimek eltérő helyeken hasíthatják a fehérjét, így a különböző proteázok alkalmazása eltérő peptidek detektálását teheti lehetővé.^{41,50} Az emésztési lépés után a sómentesítés érdekében egy újabb tisztítási lépés elvégzése szükséges, erre alkalmas módszer a szilárd fázisú extrakció C₁₈ töltetű oszlopokkal.¹

2.2.3. Szilárd fázisú extrakciós tisztítási módszerek

Az előbbi fejezetben bemutatam, hogy a biológiai mintáknak rendkívül összetett mintaelőkészítési folyamaton kell keresztül menniük, mely során szükséges akár a mintából származó, akár az előkészítés során bevitt sóktól és szennyezőktől való tisztításuk.^{51,52} Ez többek között azért is fontos, mert a tömegspektrometria egy nagyon érzékeny analitikai módszer, ezért kis mennyiségű szennyező anyag is képes elnyomni a mérni kívánt komponensek jeleit.^{18,52-54} Ezen szennyeződések eltávolítása érdekében a leggyakrabban szilárd fázisú extrakciót alkalmaznak, melynek alapja a mintát alkotó vegyületek megoszlása a szilárd és a folyadék fázisok között.^{51,55}



5. ábra: C₁₈ SPE tisztítás sematikus folyamatábrája

A szilárd fázisú extrakció elve nagymértékben hasonlít a kromatográfiás módszerekéhez, azonban fontos különbség az, hogy míg a kromatográfiás eljárások esetében a minta összes frakciója a detektorba jut, addig az SPE esetében a minta egy része elveszik, és mivel csak a mérés szempontjából fontos komponensek kerülnek izolálásra, csökken a minta komplexitása.⁵⁵ Az SPE módszerekkel szemben támasztott elvárások, hogy hatékonyan távolítsa el a szennyezőket a peptideket tartalmazó mintából, valamint ne változtassa a tisztítatlan mintához képesti peptid összetételt és arányt, minden komponens vesztesége hasonló legyen.^{1,55}

Az SPE tisztítási módszerek folyamata négy szakaszra osztható. Első szakaszban a szilárd állófázis aktiválása és kondicionálása történik, ezzel érhető el, hogy a töltet nedvesedjen, és egyensúlyi állapotba kerüljön. Ennek köszönhetően a folyamat reprodukálhatóbbá válik. Ezután következik a minta felvitele az SPE oszlopra, mely során az elválasztás céljának megfelelő töltettel rendelkező állófázis megkötí a szükséges anyagokat, és átengedi a szennyezőket. A harmadik szakaszban az esetlegesen fennmaradt szennyezők eltávolítása következik mosási lépések segítségével. Végül negyedik lépésként a szennyezőktől megtisztított minta elúciója történik.⁵⁵

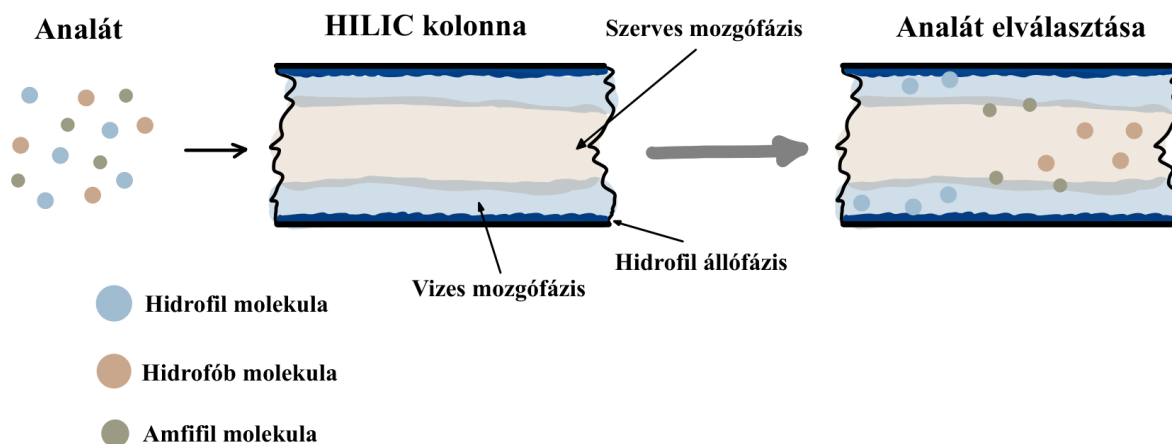
Az SPE állófázis és a tisztítási eljárás menete is nagyban befolyásolja a proteomikai vizsgálatok sikerességét. A peptidek és fehérjék SPE tisztítására általában fordított fázisú elválasztást alkalmaznak, melynél az állófázis hidrofób, a mozgófázis hidrophil jellegű.⁵⁵ Kísérleteim során a különböző eredetű peptidminták referencia tisztítására C₁₈ töltettel rendelkező oszlopokat használtam.

2.2.4. Alternatív mintaelőkészítési módszerek

A 2.2.2. és 2.2.3. fejezetekben bemutatott mintaelőkészítési módszer nagy hátránya, hogy minden egyes lépésnél felléphet mintaveszteség. A C₁₈ tisztítás további hátrányai, hogy a tisztítási lépések során jelentős anyagveszteség jelentkezhet⁵⁵, valamint ez a tisztítási módszer inkább koncentrálna, mint eltávolítja a polimer szennyezőket (pl.: poli(etilén-glikol), PEG), ez pedig komoly gondokat okozhat az MS mérésnél.⁵ Többek között ezeket a hátrányokat célozzák kiküszöbölni az SP3⁶, SP2⁵ és SP4⁴ módszerek, melyek az SP4 módszer kivételével paramágneses gyöngyök alkalmazásán alapulnak, míg az SP4 tisztítás során szerves oldószeres kicsapásra és centrifugálási lépésekre támaszkodik a mintaelőkészítés.

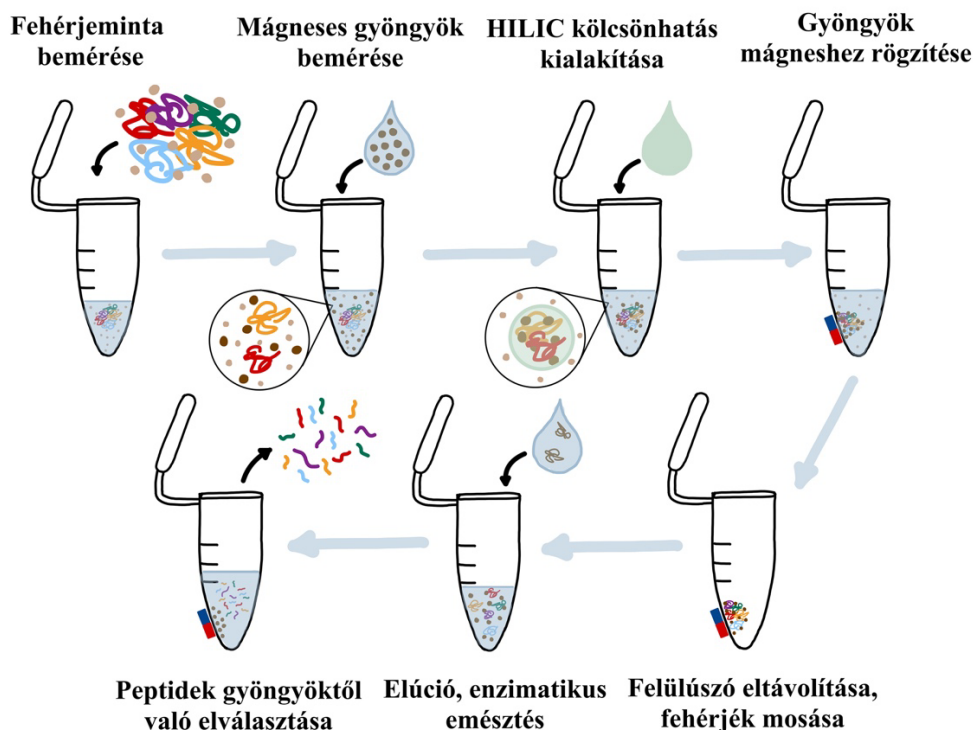
Az SP3 módszer

Az SP3 munkafolyamat karboxilát funkciós csoportokkal ellátott paramágneses gyöngyökön alapul, melyhez a redukált, alkilált és denaturált fehérjék hidrophil kölcsönhatás segítségével rögzülnek. A kölcsönhatási mechanizmus analóg a hidrophil kölcsönhatás kromatográfiában (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC) használt mechanizmussal, melyben a mozgófázis szerves komponense (pl.: víz) a hidrophil állófázis felületén egy réteget hoz létre, míg az szerves fázis (pl.: etanol) attól a lehető legtávolabb helyezkedik el. Az eltérő hidrophilitással rendelkező célkomponensek megoszlának a mozgófázis szerves és szervesetlen részei között.⁵⁶



6. ábra: A HILIC elválasztás leegyszerűsített folyamatábrája

Az SP3 mintaelőkészítési módszer minden lépése egyetlen Eppendorf csőben zajlik, ennek köszönhetően könnyen és gyorsan elvégezhető a minta redukálása, alkilálása, denaturálása, majd emésztése és végül a tisztítása. Előnyei közé tartozik még, hogy alacsony a költsége, és lehetséges a folyamatot egyedi hardver nélkül is robotizálni. Ezen előnyös tulajdonságok miatt széles körben alkalmazzák a módszert különböző biológiai minták (pl.: immunsejtek^{37,57}, tumorszövetek^{58,59} és extracelluláris mátrixkeverékek⁶⁰) MS vizsgálatra való előkészítéséhez.



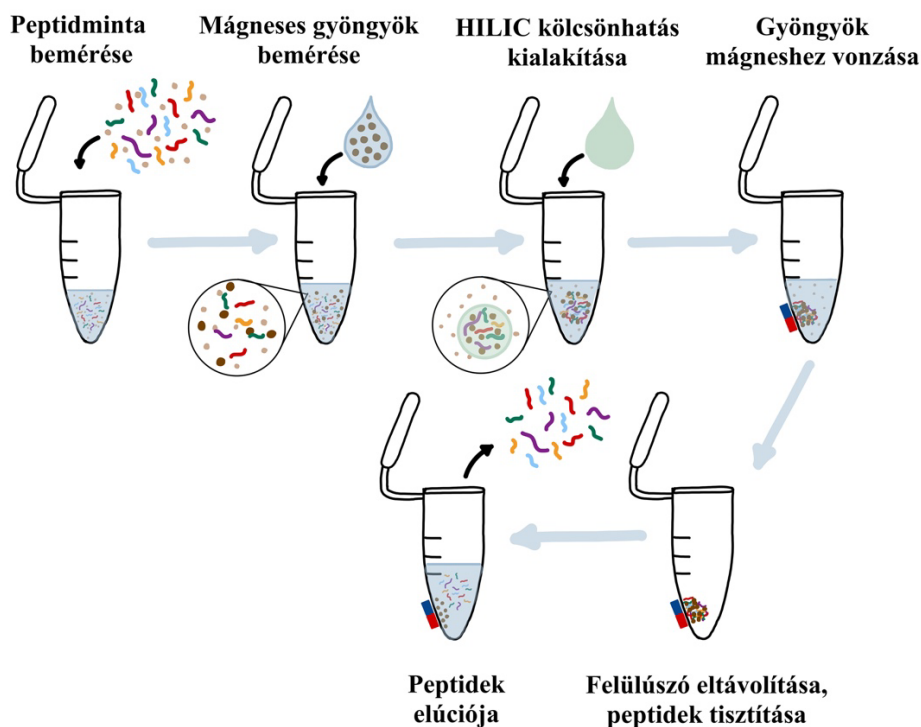
7. ábra: A fehérjék tisztítására alkalmas SP3 protokoll sematikus folyamatábrája

Az SP3 folyamat során (7. ábra) első lépésként elvégzik a fehérjét tartalmazó minta redukálását, alkilálását és denaturálását, majd ehhez az előkészített fehérjeoldathoz adják

hozzá a karboxilát csoportokkal ellátott mágneses gyöngyöket. Az elegyhez szerves oldószert adva fehérjék rögzülnek a gyöngyökön, melyeket egy mágnes segítségével az Eppendorf cső oldalához lehet vonzani, így a szennyezőket tartalmazó felülúszó könnyen eltávolítható. A folyamatban ezután több szerves oldószeres mosási lépés következik, majd vizes pufferoldat hozzáadására bekövetkezik az elúció. Ezután a tisztított fehérjék az oldatban, a mágneses gyöngyökhöz már nem rögzülve, endopeptidáz enzimek hozzáadásával peptidekké emészthetők, végül a peptidoldat egy centrifugálási lépés után könnyen lepipettázható az összeállt gyöngyök mellől. Az így elkészített mintaoldat akár azonnal vizsgálható LC-MS módszerrel.⁶

Az SP2 módszer

A szakirodalomban találni olyan publikációkat, melyben már alkalmaztak karboxilát csoportokkal ellátott paramágneses gyöngyöket peptidminták C₁₈ tisztítása után megmaradt szennyeződéseinek eltávolítására.^{61,62} Azonban ezekben a cikkekben a mintaelőkészítés részletei nem lettek ismertetve, valamint nem esett szó a módszer C₁₈ tisztítás helyetti használatáról. Az SP2 egy kifejezetten peptidek tisztítására kidolgozott eljárás, mely bizonyítottan alkalmazható foszfopeptidek és glikopeptidek szennyezőinek eltávolítására.



8. ábra: A peptidek tisztítására alkalmas SP2 protokoll sematikus folyamatábrája

A komplex proteomikai minták SP2 tisztítása előtt elvégzendők a proteomikai előkészítésekénél megszokott feltárási és szolubilizálási lépések, majd az enzimatis

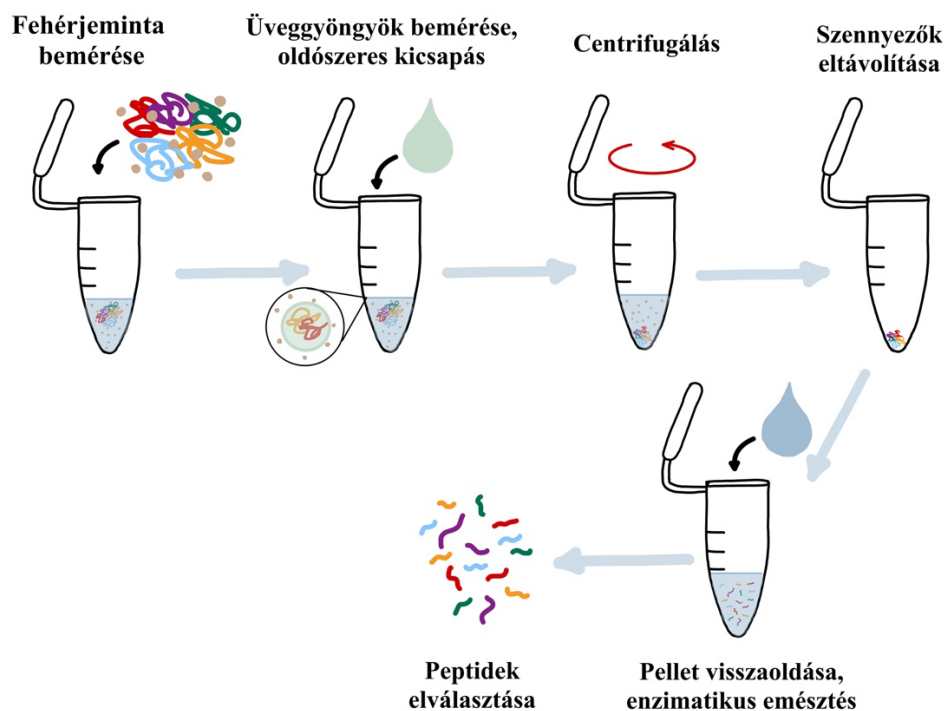
emésztés, végül az így kapott peptideket tartalmazó elegyhez kell hozzáadni a mágneses gyöngyöket. Fontos ennél a pontnál megjegyezni, hogy a protokoll fejlesztői azt tapasztalták, hogy a peptidek gyengébben rögzülnek a gyöngyökhöz, mint a fehérjék ezért nagyobb mennyiségű mágneses részecske alkalmazása szükséges az SP3 módszerhez képest a kisebb anyagvesztés elérése érdekében.⁵ A következő lépésben a rendszerhez adják a szerves oldószert, hogy kialakuljon a HILIC jellegű kölcsönhatás a gyöngyök és a peptidek között. Ezután egy mágnes segítségével az Eppendorf cső falához rögzítik a gyöngyöket a peptidekkel együtt, ekkor eltávolítható a szennyezéseket tartalmazó felülúszó. Az előbbi lépést követően egy újabb mosási szakasz következik szerves oldószerrel, majd az elúció egy vizes oldattal. Az elúciót követően egy centrifugálási lépés után választható el a peptideket tartalmazó oldat a mágneses gyöngyöktől, és akár azonnal LC-MS módszerrel vizsgálható.⁵

Az SP4 módszer

Az SP4 módszer elve eltér az SP3 és SP2 protokollokétól, mivel itt a tisztítás során nem a HILIC kölcsönhatást használják ki, hanem egy szerves oldószeres kicsapásnak köszönhetően nyerhető ki a fehérjék. A mintaelőkészítés elvégezhető üveggyöngyökkel, de azok használata nélkül is, mivel ennél a módszernél az üveggyöngyök csupán azt a funkciót szolgálják, hogy jobban láthatóvá teszik a pelletet. Az eljárás előnye, hogy kiküszöbölhető vele az SP3 módszer egyik hátránya, miszerint a hidrofób fehérjék rosszabb hatásfokkal rögzülnek a karboxilált paramágneses gyöngyökre, így az SP4 tisztítással eredményesebben tisztíthatók a hidrofób fehérjéket tartalmazó minták.⁴

Az SP4 mintaelőkészítés első lépéseként a fehérjéket tartalmazó mintaelegy redukálása, alkilálása és denaturálása történik. Amennyiben a tisztítás során alkalmaznak üveggyöngyöket, azok hozzáadása következik, majd szerves oldószer hozzáadásával megtörténik a fehérjék kicsapása. Az oldószeres kicsapás lépésnél fontos arra odafigyelni, hogy csak megfelelő szerves oldószer koncentráció esetében következik be a fehérjék kicsapódása, ami jellemzően legalább 80%. Miután megtörtént a kicsapás, centrifugálási lépés következik, így a kivált fehérjék a gyöngyökkel, vagy anélkül az Eppendorf cső alján gyűlnek össze, a szennyezőket tartalmazó felülúszó pedig könnyen eltávolítható. Ezután a pellet mosása történik szerves oldószerrel, majd újabb centrifugálási lépés. Az utolsó felülúszó eltávolítása után következik a fehérjék visszaoldása, mely során egy vizes pufferoldatot használnak, majd elvégezhető a fehérjék enzimatis emésztése.

Amennyiben üvegyöngyökkel végzik a tisztítást, az emésztés után egy újabb centrifugálási lépést követően választható el a tisztított peptidminta a gyöngyöktől.⁴



9. ábra: Fehérjék tisztítására alkalmas SP4 módszer sematikus folyamatábrája

SP3, SP2 és SP4 összehasonlítása

Azért, hogy a bemutatott három módszer közti hasonlóságokat és különbségeket jobban szemléltessem, a 2. táblázatban mutatom be azokat.

2. táblázat: Az SP3, SP2 és SP4 proteomikai mintaelőkészítési módszerek összehasonlítása. (*névleges fehérjemennyiség alapján számolva) EtOH – etil-alkohol, ACN – acetonitril, ABC – ammónium-bikarbonát, H₂O – víz

	SP3	SP2	SP4
Minta	Fehérje	Peptid	Fehérje
Gyöngyök*	paramágneses 10× felesleg	paramágneses 20× felesleg	üveg 10× felesleg
Rögzítéshez használt oldószer	EtOH (50% végkoncentráció)	ACN (95% végkoncentráció)	EtOH (80% végkoncentráció)
Tisztításhoz használt oldószer	EtOH (80%)	ACN (absz.)	EtOH (absz.)
Elúcióhoz/visszaoldáshoz használt oldószer	ABC (100mM)	H ₂ O (2% ACN)	ABC (100mM)
Emésztés	Elúció után a gyöngyök mellett	Tisztítás előtt	Üvegyöngyök mellett (ha van)

Az előbbi fejezetekben ismertettem három alternatív módszert a proteomikai mintaelőkészítésekre. Melyek mindegyikének előnye, hogy az irodalmi protokollok leírása szerint nem szükséges C₁₈ tisztítást elvégezni utánuk, és egy Eppendorf csőben elvégezhető az előkészítési, tisztítási és emésztési folyamatok összes lépése. Ezeken túl mindhárom bemutatott módszernek megvannak az egyedi előnyei és hiányosságai.

Míg az SP3 módszer kiválóan alkalmazható fehérjeminták tisztítására, és jobb eredmények érhetőek el vele, mint az egyéb általánosan alkalmazott módszerekkel.^{6,37,63,64} Addig az SP2 módszer hatékonyan használható peptidminták tisztítására, így kivitelezhető vele szövetmetszetekből kinyert peptidminták tisztítása is. Viszont egyik paramágneses gyöngyöket alkalmazó módszer esetében sem esik szó a hidrofób fehérjék, például membránfehérjék mágneses gyöngyökhöz való rögzítésének lehetőségéről.⁴ Az SP4 módszerrel az irodalom szerint jobban visszanyerhetők a hidrofób fehérjék a paramágneses gyöngy alapú módszerekhez képest. Azonban főleg csak nagyobb mintamennyiségek esetén alkalmazható jól, mivel a tisztítási lépések során a szabad szemmel nem látható pelletről a felülúszó eltávolítása nehezen reprodukálható.⁴ Ezen szempontok alapján kijelenthető, hogy egyelőre nem létezik általánosan felhasználható előkészítési és tisztítási módszer, mely mind fehérje és peptidmintákra, széles polaritás és mintamennyiség tartományban alkalmazható lenne.

2.3. Kromatográfiai módszerek

A mai korszerű analitikai módszerek célja általában az, hogy minél több mintáról, minél kisebb mintamennyiségből, minél gyorsabban adjon információt a minta összes komponenséről. Tehát az az alapvető elvárásunk a különböző analitikai módszerektől, hogy érzékenyek, nagy felbontásúak, nagy áteresztőképességűek és megbízhatóak legyenek. Ugyanezt várjuk el a korszerű nagyhatékonyságú elválasztástechnikai berendezésektől.^{1,65}

Ahogy az a korábbi fejezetekben látható, a „*bottom-up*” proteomikai munkafolyamat esetében peptidmintákat vizsgálnak HPLC-MS/MS készülékekkel. A kromatográfiai folyamat során a peptidkeverék elválasztása történik meg, hogy azok többnyire elkülönülten kerüljenek a tömegspektrométerbe, így csökkentve a minta komplexitását. A fehérjék és peptidek számos tulajdonsága (méret, alak, töltés, izoelektromos pont, hidrofóbicitás, hidrofilicitás stb.), kémiai reakciói (komplexbépzés) és biológiai kölcsönhatásai (antigén-antitest) alkalmasak azok elválasztására, frakcionálására.^{1,66}

A „*bottom-up*” proteomikai módszereknél két lehetőség van a minta komplexitásának csökkentésére. Az első esetben, még a fehérjét tartalmazó minta előkészítési lépései előtt alkalmaznak elektroforetikus vagy kromatográfiás módszert a fehérjék frakcionálására, majd ezen frakciók emésztése történik peptidekké, végül pedig a frakciókat nagyhatékonyságú kromatográfiával tovább szeparálják. A másik lehetőség az, hogy a mintában lévő összes fehérje egyszerre hidrolizálásra kerül, majd az így kapott peptidkeveréket szeparálják egy- vagy többdimenziós nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával. Természetesen az így analizált minták esetében sem érhető el az, hogy a kromatográfiás lépés után egyszerre csupán egy peptid jusson be a tömegspektrométerbe, azonban nagyobb az esélye, hogy a minta minél több komponense azonosítható lesz.^{1,39,40}

A kromatográfia egy olyan elválasztástechnikai módszer, amelynél a minta komponenseinek az elkülönítése két egymással érintkező fázis közötti megoszláson alapul. A kromatográfiás módszerek esetében az egyik fázis minden esetben egy helyhez kötött állófázis, a másik pedig egy folyamatosan adagolt mozgófázis. Miután a mozgófázissal bevitt minta komponensei érintkezésbe kerülnek az állófázissal, és különböző erősségű kölcsönhatást alakítanak ki azzal, változik a relatív megoszlásuk a két fázis között, így a minta folyamatos szorpció és deszorpció lépéseinek eredményeképpen a különböző jellegű komponensek elválasztódnak.

A folyadékkromatográfiás módszereket csoportosíthatjuk az állófázis szemcsemérete, alakja és az elválasztás mechanizmusa szerint, és csoportokba oszthatók még az álló- és mozgófázis egymáshoz képesti polaritása alapján, ezeket 3. táblázatban ismertetem a teljesség igénye nélkül.

3. táblázat: Különböző folyadékkromatográfiás módszerek álló- és mozgófázisai

Folyadékkromatográfiás módszer		Állófázis	Mozgófázis
NP-HPLC ⁶⁷	normál fázisú folyadékkromatográfia	poláris	apoláris
RP-HPLC ⁶⁸	fordított fázisú folyadékkromatográfia	apoláris	poláris
RP-IP-HPLC ⁶⁹	fordított fázisú ionpár kromatográfia	apoláris	poláris + ionpárképző
HILIC ⁷⁰	hidrofil kölcsönhatás kromatográfia	poláris	kevésbé poláris
HIC ⁷¹	hidrofób kölcsönhatás kromatográfia	enyhén apoláris	negatív sógradiens
IEC ⁷²	ioncserés kromatográfia	ionos	puffer

A proteomikában a leggyakrabban a vizes közegű minták elválasztására alkalmas fordított fázisú folyadékkromatográfiát (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC) alkalmazzák, melynél a mozgófázis (acetonitril, metanol) polárisabb, mint az állófázis (apolárisan módosított szilikagél). Az RP-HPLC elválasztások során alkalmazott állófázisok a felhasználó igényei szerint választhatók meg aszerint, hogy milyen polaritású minta elválasztása a cél, mivel a szilikagél tetszőlegesen módosítható különböző apoláris csoportokkal. A módszer lehetővé teszi a gradiens elúciót is, ekkor a gyenge és az erős eluens aránya a felhasználó által meghatározott módon változik. Az RP-HPLC elválasztás során annak jellegéből adódóan először a polárisabb mintakomponensek választódnak el, mivel ezek alakítják ki a leggyengébb kölcsönhatásokat az apoláris állófázissal.

A folyadékkromatográfiás módszerek csoportosíthatók az alkalmazott kolonna átmérője szerint is, így megkülönböztethető analitikai LC ($d = 3 - 4,6$ mm), „*narrow-bore*” LC ($d = 2,1$ mm), „*micro-bore*” ($d = 1$ mm), mikro vagy kapilláris LC ($d = 0,25 - 0,50$ mm) és nano LC ($d = 0,075 - 0,150$ mm). Minél kisebb a kromatográfiás oszlop átmérője, annál kisebb mennyiségű minta analizálására alkalmas.¹

A proteomikai mintákban található peptidláncok hosszának és szerkezetének egyedisége miatt azok eltérő nagyságúak, alakúak, töltésűek, polaritásúak és hidrofilitásúak. Ebből kifolyólag könnyen belátható, hogy a peptidek sokféle tulajdonságú állófázissal képesek kölcsönhatást kialakítani, ezáltal azok többek között méretkizárásos, ioncserés, affinitás, fordított fázisú és hidrofil kölcsönhatáson alapuló kromatográfia segítségével is elválaszthatók. A rendelkezésre álló kis mintamennyiségek miatt általában mikro, kapilláris vagy nano LC kolonnákat alkalmaznak a proteomikai mérések során.^{1,66}

2.4. Tömegspektrometriai mérések

A proteomikai vizsgálatoknál manapság az előkészített peptid- vagy fehérjemintákat a folyadékkromatográfiás elválasztás után egy tömegspektrométer segítségével analizálják^{2,53}, ami alkalmas kis mennyiségű komplex összetételű biológiai minták komponenseinek mennyiségi és minőségi meghatározására. A módszer előnyei többek között, hogy kiváló érzékenységgel képes a minták gyors analizálására, továbbá szelektív, nem utolsósorban pedig nagy előnye, hogy kapcsolható folyadékkromatográfiával. Az MS hátránya azonban, hogy az eredményként kapott nagyszámú spektrum értékelése összetett feladat, továbbá ezekből gyakran csak korlátozott szerkezeti információ

nyerhető. Mindezeknek köszönhetően, illetve ezek ellenére a fehérjék és peptidek tömegspektrométerrel végzett vizsgálata ma már rutinfeladatnak minősül.^{1,14,53,73}

A tömegspektrometriai mérések első lépése az analizálandó minta bejuttatása. Ez a kromatográfiával kapcsolt berendezések esetén az elválasztás után automatikusan történik, eltérő esetben direkt infúzióval jut be a vizsgálandó analát. Ezután a komponensek ionizálása következik, amihez különböző ionizációs módszerek alkalmazhatók. A proteomikai vizsgálatoknál a lágy ionizációs módszereket (pl.: elektroporlasztás, MALDI) részesítik előnyben.⁷⁴ Az ionizáció során keletkezhetnek molekulaionok vagy „anyaionok”, valamint ezek töredékei, a fragmensionok vagy „leányionok”. A képződött ionok az analizátorba (pl.: repülési idő analizátor, kvadrupól, Orbitrap)⁷⁵ kerülnek, ahol m/z értékeik alapján elválnak, majd így jutnak a detektorba, ami meghatározza az adott ionok mennyiségét. Végül a felhasználó egy számítógépes szoftveren keresztül kromatogramot és tömegspektrumot kap, melyet a rendelkezésére álló programok és adatbázisok segítségével tud kiértékelni.¹

Az ionizáció során képződött ionok töltése alapján megkülönböztethető a pozitív és a negatív ionizáció. A proteomikai analíziseknél általában olyan technikákat alkalmaznak, mely következtében pozitív töltésű ionok keletkeznek. A töltést ilyenkor protonok vagy kationok (pl.: Na^+ , K^+) hordozzák, melyek a molekulákkal adduktot hoznak létre (pl.: $[\text{M}+\text{H}]^+$). Elektroporlasztásos ionizáció esetében gyakran lehet többszörösen töltött ionokkal is találkozni, ebben az esetben egynél több töltést hordozó részecske fog a molekulához kapcsolódni (pl.: $[\text{M}+\text{nH}]^{\text{n}+}$).^{1,14,73}

A tömegspektrométerek fontos paramétere a felbontás (R). A spektrumban található csúcsok a legtöbb esetben Gauss eloszlást követnek, a csúcsok szélessége pedig az analizátor típusától függ. Az MS felbontása nagymértékben befolyásolja a megkülönböztethető molekulatömeg eltéréseket. A nagyfelbontású MS készülékekkel az ionok tömege 0,1-5 ppm pontossággal mérhető, így kismolekulás minták esetében akár az elemi összetétel is meghatározható, és a minél nagyobb felbontásnak köszönhetően két kismértékben eltérő molekulatömegű ion is megkülönböztethető.^{14,76}

A fehérjék és peptidek vizsgálatára általában az elektroporlasztásos ionizációt (*Electrospray Ionization*, ESI)⁷⁴, vagy ennek a nanoáramlásos változatát (nanoESI), valamint a mátrixszal segített lézer deszorpcióos ionizációt (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI)⁷⁴ alkalmazzák. A proteomikai kutatásokban rendkívül előnyös a nano-HPLC elválasztáshoz kapcsolt nanoESI, mivel kisebb áramlási sebesség esetében jobb ionizációs hatékonyság érhető el. A nanoESI ionizációs módszernél a

mintaoldat egy kapillárison keresztül áramlik az ionforrás felé, ahol porlasztógáz, fűtés és nagyfeszültség hatására megkezdődik az ionképzés. A kapilláris és az elektród között elektrosztatikus tér alakul ki, melynek következtében a kapillárisból töltéssel rendelkező cseppek képződnek. Amennyiben az ionizáció MALDI technikával történik, a mintát egy olyan molekulával kristályosítják együtt, amely az alkalmazott lézer hullámhosszán nagymértékű fényelnyelést mutat. A lézer hatására a mátrix ionizálódik, a minta molekulái a mátrixszal együtt lépnek gázfázisba (deszorpció), és a deszolvatáció következtében a mátrix ion átadja a töltését a minta molekulának.^{1,14,76}

A képződött ionok ezután az analizátorba kerülnek, ahol az ionok elválasztása történik az m/z értékük alapján. Az analizátor fajtája egyértelműen meghatározza a tömegspektrométer lehetőségeit és korlátait. Meg lehet különböztetni kislebontású (kvadrupól, ioncsapda) és nagyfelbontású (repülési idő, Orbitrap és ion ciklotron rezonancia) analizátorokat.⁷⁵ A proteomikában előszeretettel alkalmazzák az Orbitrap és repülési idő analizátorokat, az utóbbinak nagy előnye, hogy ennek van a legnagyobb mérési tömegtartománya és gyors spektrumfelvételre alkalmas.^{1,75}

A proteomikában elterjedt módszer a tandem tömegspektrometria, mellyel részletesebb információ kapható a vizsgált anyagról. Ilyenkor a képződő ionokat (molekulaion vagy anyaion) az analizátorban egyenként kiválasztják, majd egy gerjesztési lépés segítségével fragmentálják, és a fragmens ionokat az m/z értékük alapján választják el. Mivel a molekulaionok szabályszerűen fragmentálódnak, így ennek a módszernek köszönhetően azok szerkezetéről is lehet információt nyerni, nem csak a tömegéről. Ez különösen fontos a peptidok vizsgálata esetén, hiszen csak a molekulatömeg nem ad információt a peptidszekvenciáról. Összetett minták esetén pedig az egyes komponensekről tiszta spektrum is kapható.^{77,78}

2.4.1. Tömegspektrometriai adatgyűjtési módszerek

A tömegspektrometriás adatgyűjtési technikák két nagy csoportba sorolhatók aszerint, hogy a mérés célja teljesen ismeretlen minták globális analízise, melyre a „shotgun”⁷⁹ módszerek alkalmasak, vagy pedig specifikusan egy célzott fehérje vizsgálata.¹ A proteomikában legáltalánosabban egy ismeretlen minta egészének megismerése a cél, így a „shotgun” módszereket alkalmazzák. A tömegspektrumok felvétele két mérési technikával történhet: adatfüggő (*Data Dependent Analysis*, DDA)⁸⁰ vagy adatfüggetlen (*Data Independent Analysis*, DIA)⁸¹ módon.

A DDA adatgyűjtési módszer esetén a tömegspektrométer ciklusokban mér. Minden ciklus elején egy pásztázó MS analízis történik, mely információt ad a kolonnáról érkező peptidek m/z értékéről, majd a szoftver kiválasztja a legintenzívebb tömegeket, melyekről fragmentációt követően MS/MS spektrum készül. Az adatfüggő mérés során felvett MS/MS spektrumok alapján meghatározható a mintában lévő peptidek szerkezete, majd következtetni lehet adatbázisok segítségével a kiindulási minta fehérjéire és azok mennyiségére. A DDA módszer hátránya, hogy rossz a reprodukálhatósága, mivel a nagy komplexitású minták esetében sok véletlen eseményen múlik, hogy ismételt injektálás esetén ugyanaz lesz-e az egyes ionok intenzitása, és ugyanazok az ionok kerülnek-e fragmentálásra. Hiányossága még, hogy a kis intenzitású peptidekről nem készül MS/MS spektrum, így nem történik meg a szerkezeti jellemzése és fehérjéhez való hozzárendelése. Ez a technika nagyon érzékeny a nagyobb mennyiségben jelenlévő szennyezőkre, például a keratinra.^{1,80}

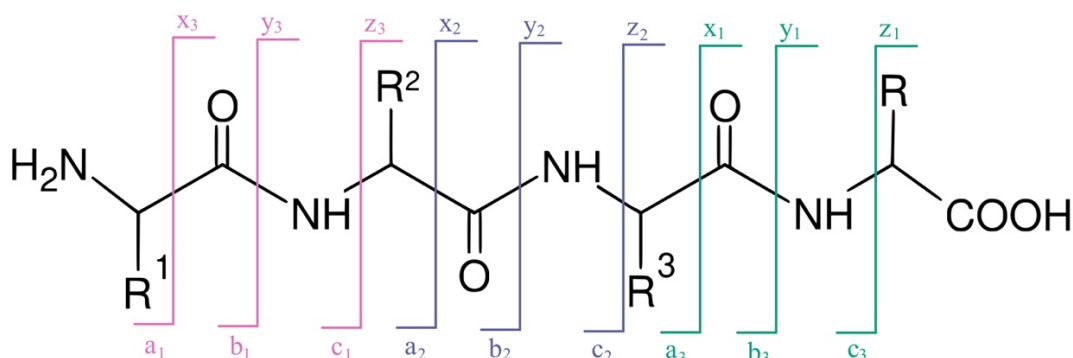
Az adatfüggő mérési módok legnagyobb hátrányára nyújt megoldást az adatfüggetlen adatgyűjtési módszer, mely során ciklusonként, tömegtartományonként fragmentált prekursor ionokból készül MS/MS spektrum. A DIA előnye, hogy kis mennyiségben jelenlévő fehérjékről is nyerhető információ, és jobb reprodukálhatósággal rendelkezik, mint a DDA, valamint alkalmas kvantitatív vizsgálatokra. Hátrányai, hogy az azonosítások megbízhatósága csökken, speciális szoftverek szükségesek az eredmények elemzéséhez, és csak az erre a célra is alkalmas tömegspektrométereken alkalmazható.^{1,81}

2.5. Proteomikai mérési eredmények értékelése, fehérjeazonosítás

A peptidek azonosítása az őket alkotó aminosavak és azok sorrendjének meghatározása alapján történik az MS/MS spektrumokból. Mivel a peptidek az ionizációs és fragmentációs lépések során meghatározott módon töredeznek, így lehetséges az őket alkotó aminosavak sorrendjének a meghatározása, akár adatbázis alapján, vagy de novo szekvenálással.⁸²⁻⁸⁵

Miután az analizátor segítségével kiválasztotta az aktiválandó prekursor iont, annak gerjesztése többféle módon is történhet: erőtérben történő gyorsítás után atomokkal, semleges molekulákkal, ionokkal vagy elektronbefogással. A proteomikai vizsgálatok során a gázmolekulákkal történő ütközés indukált disszociációt (*Collision Induced Dissociation*, CID)⁸⁵ alkalmazzák leggyakrabban. A fragmentáció a peptidlánc mentén történik, és az alkalmazott aktiválási módszertől függően eltérő fragmensionok keletkeznek. Amennyiben a töltés az N-terminális aminosavat tartalmazó fragmenszen van,

akkor a hasadás helyétől függően a-, b- és c-ionokról van szó, ha pedig a C-terminális aminosavat tartalmazó fragmensen van a töltés, akkor x-, y- és z-ionokat lehet megkülönböztetni. CID aktiválás esetén jellemzően b és y fragmensek keletkeznek.¹



10. ábra: Peptidek fragmentációs nevezéktana

A peptidek azonosítása az MS/MS spektrumok alapján adatbáziskereséssel történik, mely során a felvett spektrumokat hasonlítják az adatbázisban szereplő fehérjék *in silico* emésztésével kapott peptidek *in silico* fragmenseinek elméleti spektrumához. Miután a peptidek azonosítása megtörtént, az egyes fehérjék előfordulásának valószínűségét elemzi a szoftver, majd megfelelő valószínűség esetén azonosítottként tekinti azokat. A proteomikai vizsgálatoknál csak azok a fehérjék azonosíthatók, melyek szerepelnek a kereséshez alkalmazott adatbázisban (pl.: Uniprot humán fehérje adatbázis). A proteomikai vizsgálatok kiértékeléseinek maximum 1% hamis találati arányt (*False Discovery Rate*, FDR) engednek meg, valamint a fehérjék azonosításához legalább két egyedi peptid találat a követelmény.¹

A proteomikai mérések során azonban nem csak a minőségi azonosítás a cél, hanem a mintát alkotó fehérjék mennyiségi analízise is, mivel a kvantitatív információkból következtetéseket lehet tenni egy szervezet állapotának a megváltozására. A mennyiségi meghatározáshoz alkalmazhatnak izotópjelzéses és jelölésmentes módszereket is.^{86–90} A jelöléses technikák során az izotópjelzéssel ellátott peptid a teljes mintaelőkészítési és elválasztási folyamat alatt azonosan viselkedik a jelöletlen párjával, azonban a tömegspektrumban közöttük tömegkülönbség lesz tapasztalható. Az így kapott két csúcs arányából következtetni lehet a peptid és a fehérje abszolút mennyiségére.⁸⁶ A jelölésmentes módszerek esetén a kvantitatív analízis egyszerű spektrumszámláláson, vagy csúcsintenzitás elemzésen alapul.^{88,89} Az előbbi esetben a szoftver az adott fehérjéhez tartozó peptidről készült MS/MS spektrumokat számlálja, míg az utóbbinál az adott peptid kromatográfiás csúcsa alatti terület alapján lehet a fehérje mennyiségére

következtetni. A jelölésmentes mennyiségi meghatározási módszerek olcsóbb és egyszerűbb alternatívái a jelöléses módszereknek, azonban kisebb a pontosságuk, és kizárólag relatív fehérjemennyiségek meghatározására alkalmazhatók, abszolút kvantifikálásra azonban nem.

A szoftveres és adatbázisos támogatással sem egyszerű feladat a fehérjék azonosítása és kvantifikálása, mivel a keresési paraméterek megfelelő beállítása kulcsfontosságú. Például ha túl sok módosítást és kihagyott hasítási helyet engednek meg a rendszernek, sokkal több fehérjét képes a program azonosítani, viszont sok ezek közül hamis találat lesz, ezzel rontva a minta analízisét. Ezért a kiértékeléshez minden esetben a kutató szakértelme szükséges.

3. Célkitűzés

Kutatómunkám célja olyan alternatív mintaelőkészítési módszerek tesztelése volt, melyek segítségével kiváltható az általánosan alkalmazott oldatban történő tripszines emésztéssel, és C₁₈ SPE oszlopon történő tisztítással végzett mintaelőkészítés. Az irodalmi protokollok alapján célom volt két saját fejlesztésű mintaelőkészítési módszer tesztelése, mely alkalmas lehet proteomikai mintaelőkészítések elvégzésére.

A mintaelőkészítési módszereket vese sejtlizátum-, tüdő sejtmembrán-, vérplazma- és prosztata szövetminták proteomikai előkészítései során teszteltem, majd a mintákat HPLC-MS/MS méréssel analizáltam. A tesztelt módszereket értékeltem az azonosított fehérjék és peptidek száma, a fehérjék módszerek közti megoszlása, izoelektromos pontja és a peptidek hossza alapján. Vizsgáltam, hogy az egyes mintaelőkészítési módszerekkel milyen hatékonyan lehetett hidrofil és hidrofób fehérjéket azonosítani. Tanulmányoztam az egyes módszerek reprodukálhatóságát és visszanyerési arányát, a kapott spektrumok tisztaságát, és értékeltem az egyes eljárások időhatékonyosságát és a lépéseinek bonyolultságát. Így a TDK dolgozatom lett az első olyan tanulmány, mely az SP2, SP3 és SP4 mintaelőkészítési módszereket sokrétűen, többféle mintán összehasonlította.

A kísérletek során szerzett tapasztalatok alapján célom egy módszer kiválasztása, mellyel a legtöbb proteomikai minta hatékony előkészítése lehetséges.

4. Felhasznált anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált anyagok

A dolgozatban szereplő kísérletek elvégzéséhez a következő anyagokat használtam fel:

Ammónium-bikarbonát, citromsav (vízmentes), nátrium-citrát, ditiotreitol (DTT), hangyasav (FA), jódiacetamid (IAA), glicerin, karbamid és trifluor-ecetsav (TFA) a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) termékei. LC-MS acetonitril, LC-MS víz, LC-MS metanol, LC-MS etanol a VWR Chemicals (Radnor, PA, USA) termékei. Pierce™ C₁₈ SPE oszlop a Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) terméke. Trypsin Gold és Trypsin/LysC MS minőségű enzimek a Promega Corporation (Madison, WI, USA) terméke. RapiGest™ a Waters Corporation (Milford, MA, USA) terméke. Ecetsav (99%) a Fluka Analytical (Seelze, Németország) terméke. A paramágneses gyöngyök (Sera-Mag™ *SpeedBead Magnetic Carboxylate Modified Particles*) a Cytiva, Danaher csoport (Washington, D.C., USA) termékei.

4.2. Alkalmazott módszerek

A mintaelőkészítési folyamatok során PV-1 típusú vortexet, PSC18 típusú termosztálható rázógépet (Grant-bio; Shepreth, Cambridgeshire, Egyesült Királyság); MSC-6000, Multi-spin típusú centrifugát és vortexet (BioSan; Riga, Lettország) Sonorex típusú szonikáló készüléket (Bandelin; Berlin, Németország), Z300 K típusú centrifugát (Hermle LaborTechnik; Wehingen, Németország) és miVac Duo típusú vákuumbepárlót (Genevac; Ipswich, Egyesült Királyság) alkalmaztam.

4.2.1. Mintaelőkészítés oldatban történő tripszines emésztéssel a C₁₈, SP2 és SPx tisztításokhoz (plazma- és membránminták)

A C₁₈, SP2 és SPx módszerekkel tisztított plazma és membrán peptidminták előkészítése a következők szerint történt. A 10 µg fehérjét tartalmazó mintát 30 µl térfogatra hígítottam víz hozzáadásával, majd a fehérjéket 1,5 µl metanol, 2 µl DTT (200 mM) és 5 µl RapiGest™ (0,5%) jelenlétében 60 °C hőmérsékleten 30 perc alatt redukáltam. Ezután 2,5 µl IAA (200 mM) és 5 µl ABC (200 mM) oldatot adtam hozzá a mintához, majd 30 percig sötétben inkubáltam szobahőmérsékleten. Az így előkészített fehérje mintát első lépésben 1:100 (enzim : minta) arányban hozzáadott tripszin/LysC enzimkeverékkel emésztettem 1 óráig, 37 °C hőmérsékleten, 250 fordulatszám/perc rázatás mellett, majd 1:10 arányban hozzáadott tripszinnel egy éjszakán keresztül

(további 17 óra) inkubáltam. Az emésztést a C₁₈, SP2 vagy SPx tisztítási módszerek egyike követte. A C₁₈ tisztítás előtt a mintákat vákuumbepárlóban szárazra pároltam.

4.2.2. Szövetfelületi emésztések (szövetminták)

A formalinnal rögzített paraffinba ágyazott (Formalin-fixed paraffin embedded, FFPE) prosztata szövetminták előkészítésének első lépéseként elvégeztem a metszetek deparaffinezését. A folyamat során a szövetmetszetek egy deparaffinező kádban inkubálódtak különböző oldószerekben, eltérő ideig (lásd: 4. táblázat), szobahőmérsékleten.

Ezután a deparaffinezett szövetmetszeteket 30 percen át 80-85 °C között inkubáltam antigénelőhívó pufferben (24,4 g nátrium-citrát, 4 g citromsav, 1000 ml LC-MS

4. táblázat: A paraffinba ágyazott szövetminták deparaffinezése során használt oldószeres mosási lépések és időtartamuk. (ABC: ammónium-bikarbonát)

Oldószer	Idő
Xilol	5 perc
Xilol	5 perc
Etanol (100%)	3 perc
Etanol (100%)	3 perc
Etanol (90%)	3 perc
Etanol (70%)	3 perc
ABC oldat (10 mM)	5 perc
Víz	1 perc

vízben), mely lépésnek célja a formalin által kialakított keresztkötések felszakítása volt.

A szövetminták emésztési folyamata során az inkubációs lépéseket minden esetben párasított dobozban végeztem el. Az előkészített metszetek redukálásához 3 µl RapiGest™ (0,1%), DTT (5 mM) és glicerint (20%) tartalmazó oldatot cseppentettem a szövetfelületre, majd 55 °C hőmérsékleten inkubáltam 20 percen keresztül. Ezután 3 µl ABC (25 mM), IAA (10 mM) és glicerint (20%) tartalmazó oldatot cseppentettem a szövetfelületre az előző cseppet megnövelve, majd szobahőmérsékleten sötétben 20 percen keresztül inkubáltam, így bekövetkezett a minta alkilálása és denaturálása. Ezt követően az emésztés első részében 3 µl tripszin/LysC (40 ng×µl⁻¹), ABC (50 mM) és glicerint (15%) tartalmazó oldatot cseppentettem a szövetfelületre, és 40 percen keresztül 37 °C hőmérsékleten inkubáltam a mintákat, ezt a lépést még egyszer megismételtem. Az emésztési folyamat második szakaszában 3 µl tripszint (200 ng×µl⁻¹), ABC (50 mM) és glicerint (15%) tartalmazó enzimes oldatot cseppentettem a szövetfelületre, majd a mintát 40 percen keresztül 37 °C hőmérsékleten inkubáltam, a tripszines emésztést még kétszer megismételtem. Az emésztési lépések után a szövet felületén lévő cseppet egy Eppendorf csőbe pipettáztam, majd a szövetet 3 µl ecetsavval

(10%) ötször mostam a keletkező peptidek kivonása céljából. A cseppeket minden esetben a korábbi Eppendorf csőbe gyűjtöttem.

A módszerek teszteléséhez a 20 szövetből származó mintákat egy Eppendorf csőbe pipettáztam, és homogenizáltam, majd egyenlő részekre osztottam a különböző módszerek tesztelése céljából, majd vákuumbepárló segítségével szárazra pároltam. Mivel a szövetfelületi emésztések esetén csak peptidminták álltak rendelkezésre, ezért ezeken csak az SP2 és SPx, és a referencia C₁₈ módszereket tudtam tesztelni.

4.2.3. Mintaelőkészítés etanolos kicsapással (referencia lizátumminták)

Először az elméleti 10 µg fehérjét tartalmazó mintához jéghideg etanolt (kilencszeres térfogat) adtam hozzá, majd egy éjszakán keresztül (17 óra) -20 °C hőmérsékleten inkubáltam. A mintáról centrifugálás (4 °C, 14 000 g, 20 perc) után óvatosan, a pelletet nem megzavarva lepipettáztam a felülúszót. Ezt követően a pelletet szintén kilencszeres térfogatú jéghideg etanollal mostam, majd centrifugálás (4 °C, 14 000 g, 20 perc) után ismét eltávolítottam a felülúszót, a mosási lépést kétszer végeztem el. A fehérjéket ezután 20 µl karbamidot (8 M) és ammónium-bikarbonátot (50 mM) tartalmazó pufferben oldottam vissza, majd a mintát 1 µl DTT (100 mM) hozzáadása után 30 percen keresztül 37 °C hőmérsékleten inkubáltam. Az előbbi lépésben redukálódott fehérjékhez 1,1 µl IAA (200 mM) oldatot adtam, majd 30 percen keresztül sötét helyen inkubáltam. Végül a redukált, alkilált és denaturált mintát ABC (50 mM) oldattal a tízszeresére hígítottam.

A mintához 1:100 (enzim : minta) arányban tripszin/LysC enzimkeveréket adtam, majd 1 óra, 37 °C, 250 fordulatszám/perc rázatás mellett emésztettem. Ezt követően 1:10 arányban tripszint adtam a mintához, majd egy éjszakán keresztül (további 17 óra) emésztettem, a folyamatot végül 0,5 µl FA hozzáadásával állítottam le. A jól homogenizált mintákat ezután vákuumbepárló segítségével szárazra pároltam.

4.2.4. Paramágneses gyöngyök előkészítése

A kétféle paramágneses gyöngyöket tartalmazó törzsoldatokból (50 µg×µl⁻¹) 1:1 arányú elegyet készítettem egy 1,5 ml térfogatú LoBind Eppendorf csőben. Homogenizálás után a felülúszót egy mágneses keret segítségével távolítottam el. A „száraz” paramágneses gyöngy keveréket ezután kétszer mostam vízzel, mely során a felülúszót minden esetben a mágneses keret segítségével távolítottam el. A gyöngyök mosása után víz hozzáadásával állítottam be a kívánt gyöngy koncentrációt (50 µg×µl⁻¹). Az így

előkészített paramágneses gyöngy „törzsoldat” 4 °C hőmérsékleten tárolva 1 hónapon keresztül felhasználható.

4.2.5. Mintaelőkészítés az SP3, SP4 és SPy módszerekkel

A módszerekhez tartozó redukálás, alkilálás és denaturálás lépések az oldatban történő tripszines emésztési protokollal megegyezők (4.2.1. fejezet). A 10 µg fehérjemintát vízzel 30 µl térfogatra hígítottam, a redukálás során 1,5 µl metanol (100%), 2 µl DTT (200 mM) és 5 µl RapiGest™ (0,5%) oldatokat adtam az elegyhez, majd 30 percen keresztül 60 °C hőmérsékleten inkubáltam. Ezután az alkilálás és denaturálás érdekében 2,5 µl IAA (200 mM) és 5 µl ABC (200 mM) oldatot pipettáztam a mintához, és 30 percen keresztül inkubáltam szobahőmérsékleten. Végül az 5. táblázatban összefoglalt lépések következtek. A gyöngyöktől való elválasztás után a mintákat, valamint az emésztés után az SP4 mintákat vákuumbepárlóban beszáritottam.

5. táblázat: Az SP3, SP4 és SPy módszerek menetét összefoglaló táblázat. felesleg: a névleges fehérje mennyiség szerinti, RT: szobahőmérséklet, ABC: ammónium-bikarbonát, rpm: fordulat/perc, SPE: szilárd fázisú extrakció

Művelet	SP3	SP4	SPy
gyöngy hozzáadása	10× felesleg	–	20× felesleg
szerves oldószer hozzáadása	etanol – 50% végkoncentráció	acetonitril– 80% végkoncentráció	etanol – 95% végkoncentráció
HILIC kialakítása	5 perc, 1000 rpm rázatás, RT	–	8 perc inkubálás, RT
centrifugálás	–	5 perc, 16 000 g	10 perc, 14 000 g
felülúszó eltávolítása	mágneses keret	óvatos pipettázás	mágneses keret
tisztítás	180 µl etanol (80%)	375 µl etanol (80%)	180 µl etanol (100%)
centrifugálás	–	2 perc, 16 000 g	10 perc, 14 000 g
ismétlés	3×	3×	2×
visszaoldás	100 µl ABC (100 mM) + 1:100 tripszin/LysC		
elúció	30 mp szonikálás	–	5 perc, 1000 rpm rázatás, RT
1. emésztés	1 óra, 37 °C		
2. emésztés	1:10 tripszin, éjszakán át, 37 °C		
elválasztás a gyöngyök mellől	3 perc 13 000 g centrifugálás	–	3 perc 13 000 g centrifugálás
extra tisztítás	–	SPE, C ₁₈ oszlopon	–

Az SP4 extra C₁₈ tisztítására azért volt szükség, mivel az előkészíteleim során azt tapasztaltam, hogy nélküle túl szennyezett a kromatogram (lásd: Függelék 9.1.).

4.2.6. Peptidek tisztítása C₁₈ módszerrel

A 4.2.1., 4.2.2. és 4.2.5. (SP4) pontok szerint előkészített minták C₁₈ töltetes oszlopon történő tisztítását a 6. táblázatban szereplő lépések szerint végeztem el. A beszárított mintákat minden esetben 50 µl TFA (0,1%) oldószerrel oldottam vissza, minden lépés után centrifugáltam (2000 fordulat/perc, 2 perc). A tisztított peptideket tartalmazó elúció frakciót vákuumbepárlóban ismét beszárítottam.

6. táblázat: A C₁₈ tisztítás lépéseit tartalmazó táblázat. TFA: trifluor-ecetsav, ACN: acetonitril

Művelet	Oldószer	Ismétlés
aktiválás	200 µl metanol (50%)	2×
mosás	200 µl TFA (0,5%) + ACN (5%)	2×
ekvilibrálás	200 µl TFA (0,1%)	2×
Eppendorf cseréje		
minta felvitel	50 µl TFA (0,1%)-ban visszaoldva	átfolyó újra felvitele
mosás	100 µl TFA (0,1%)	2×
Eppendorf cseréje		
elúció	50 µl ACN (70%) + TFA (0,1%)	2×

4.2.7. Peptidek tisztítása SP2 és SPx módszerekkel

A peptidmintákat 4.2.1. fejezetben leírtak szerint készítettem el.

7. táblázat: Az SP2 és SPx peptid tisztítási módszerek menetét összefoglaló táblázat. felesleg: a névleges fehérje mennyiség szerinti, RT: szobahőmérséklet, rpm: fordulat/perc

Művelet	SP2	SPx
gyöngy hozzáadása	20× felesleg	
szerves oldószer hozzáadása	acetonitril – 95% végkoncentráció	etanol – 95% végkoncentráció
HILIC kialakítása	8 perc inkubálás, RT	
centrifugálás	–	10 perc, 14 000 g
felülúszó eltávolítása	mágneses keret	
tisztítás	180 µl acetonitril (100%)	180 µl etanol (100%)
centrifugálás	–	10 perc, 14 000 g
ismétlés	1×	2×
visszaoldás	60 µl víz (2% acetonitril)	60 µl víz (2% etanol)
elúció	5 perc rázatás, 1000 rpm	
elválasztás a gyöngyök mellől	3 perc 13 000 g centrifugálás	

4.2.8. Műszeres analitikai vizsgálatok

A HPLC-MS/MS mérések során alkalmazott mérőműszer két részből állt: egy Waters nanoAcquity UHPLC (Waters Corporation, Milford, MA, USA) és egy Bruker Maxis II Q-TOF tömegspektrométer (Bruker, Bremen, Germany).

4.2.8.1. nano-UHPLC elválasztás paraméterei

A kromatográfiás elválasztás során az áramlási sebesség 0,3 µL/perc, az alkalmazott csapdázó oszlop egy C₁₈ töltetes Acquity UOLC M-Class Symmetry, 100Å, 5 µm, 180 µm × 20 mm (Waters, Milford, MA, USA), a mérés során használt analitikai kolonna egy Acquity UPLC M-Class Peptide BEH130 C18 analitikai kapilláris kolonna; 130Å, 1,7 µm, 75 µm × 250 mm (Waters, Milford, MA, USA). A mérés során alkalmazott *A* eluens FA (0,1%) vizes oldat, a *B* eluens FA (0,1%) acetonitriles oldat, a minta felvitele pedig az *A* eluenssel történt.

A minták vizsgálata 100 perces HPLC gradienssel történt. A *B* eluens koncentrációja 34 perc alatt 12%→25%, 20 perc alatt 25%→45% és 10 perc alatt 45%→95%-ra nőtt, majd 10 percig nem változott, ezután 0,5 perc alatt 95%→1% csökkent, végül 25,5 perc ekvilibrálás következett.

4.2.8.2. Tandem MS mérés

A tömegspektrometriás mérésem során alkalmazott ionforrás egy CaptiveSpray nanoBooster volt, mely pozitív ionizációs módban működött. A kapilláris feszültsége 1300 V, a nanoBooster gáznyomása 0,35 bar volt. A 180 °C-ra fűtött szárítógázt a készülék 3 L/perc sebességgel volt áramoltatta. A készülék tömegkalibrációjához az Agilent Technologies cégtől vásárolt alacsony koncentrációjú kalibráló keveréket alkalmaztam, valamint minden futás elején belső tömegkalibráció történt nátrium-formiát injektálásával. Az MS és MS/MS spektrumok felvétele 2,5 másodperces ciklusidővel történt a 150-2200 *m/z* tömegtartományban. A normál MS spektrumok 3 Hz gyakorisággal lettek felvéve. A nagy intenzitású prekursorokból származó fragmensionokról 16 Hz, míg a kis intenzitású prekursorból származó fragmensionokról 4 Hz gyakorisággal készült MS/MS spektrum.

Az analízishez csak a többszörös töltésű peptidek lettek felhasználva, az egyszeres töltésű peptidek nem lettek fragmentálva. Az ütközési energiát a vezérlő szoftver határozta meg a prekursor ion *m/z* értéke és töltése alapján.

4.2.9. Mérési eredmények kiértékelésének menete

A kutatómunkám alatt elvégzett méréseket különböző számítógépes programok segítségével értékeltem ki. A különböző biológiai mintákban található fehérjéket a peptidjeik MS/MS spektrumai alapján a Byonic szoftverrel azonosítottam, mely először a peptideket azonosította, majd meghatározta, hogy ezek mely fehérjéből származhatnak. A keresés során a Swissprot humán adatbázisát alkalmaztam. A Byonic azonosítás során fix módosulásként a cisztein aminosavak karbamidometilálását állítottam be az emésztési protokoll alapján, változó módosulásként pedig az aszparagin és a glutamin deamidálását és a metionin oxidációját adtam meg a szoftvernek. A keresés során megengedett eltérések prekursor ionok esetén 10 ppm, fragmensionok esetén 20 ppm voltak, és legfeljebb 2 kihagyott hasítási helyet engedélyeztem.

A kiértékelés során az azonosított peptid és fehérje találatokat tovább szűrtem. Fehérjék esetén a megbízható találatokhoz legalább 2 azonosított egyedi peptid és legalább 2 értékű LogProb (Byonic szoftver esetén a találatok megbízhatóságát jellemző pontszám) volt szükséges. Megbízható peptidtalálatokhoz pedig minimum 1,3 értékű LogProb értéket vártam el. A találatok szűrése Microsoft Excellel történt.

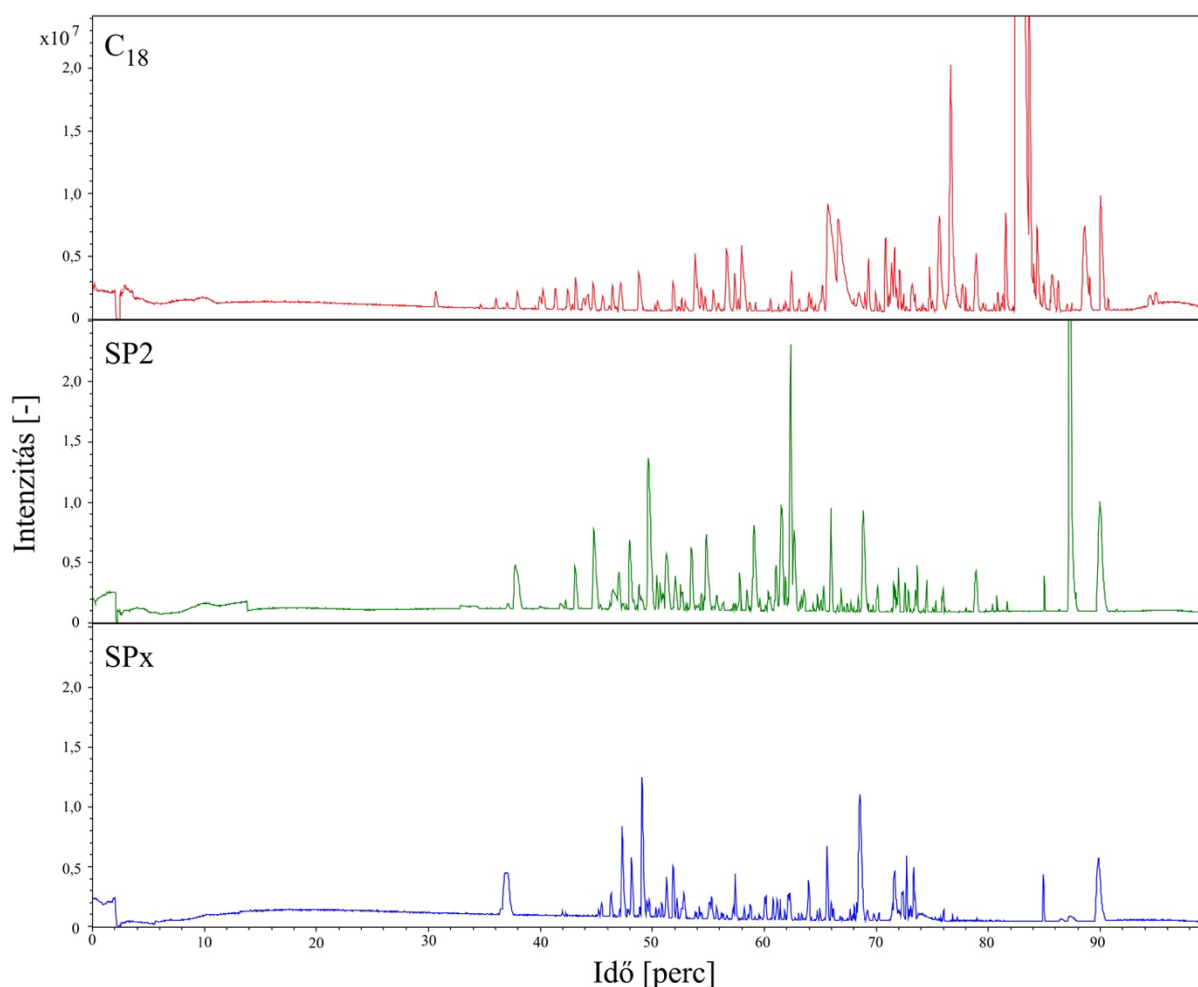
A fehérjék izoelektromos pontjának meghatározását az R *Peptide*⁹¹ csomagjának segítségével végeztem, a hidrofóbitás jellemzésére szolgáló Gravy-indexet és a peptidhosszt pedig Microsoft Excellel számoltam ki. A fehérjék mennyiségi meghatározásához MaxQuant szoftvert használtam. A mennyiségi analízis belső standard nélkül, jelölésmentes elven történt. A fehérjetalálatok módszerenkénti kvantitatív eloszlásának meghatározásához, és a Venn-diagrammok készítéséhez R-kódot írtam. Az egyes mintaelőkészítésekkel azonosított fehérjék izoelektromos pont eloszlásának, Gravy-indexének és a fehérjék relatív mennyiségének ábrázolását szintén R-ben végeztem.

5. Eredmények kiértékelése

Kutatómunkám során az irodalomban található SP3, SP2 és SP4+C₁₈, valamint a saját fejlesztésű SPy és SPx módszereket teszteltem vese sejtízátum, prosztata FFPE szövetmetszet, tüdő sejtmembrán és vérplazmaminták proteomikai előkészítése során. A mérések referenciájaként az általánosan alkalmazott oldatban történő tripszines emésztés és C₁₈ oszlopon történő tisztítás protokollt használtam (C₁₈). A mérések során minden mintából három ismételtes készült.

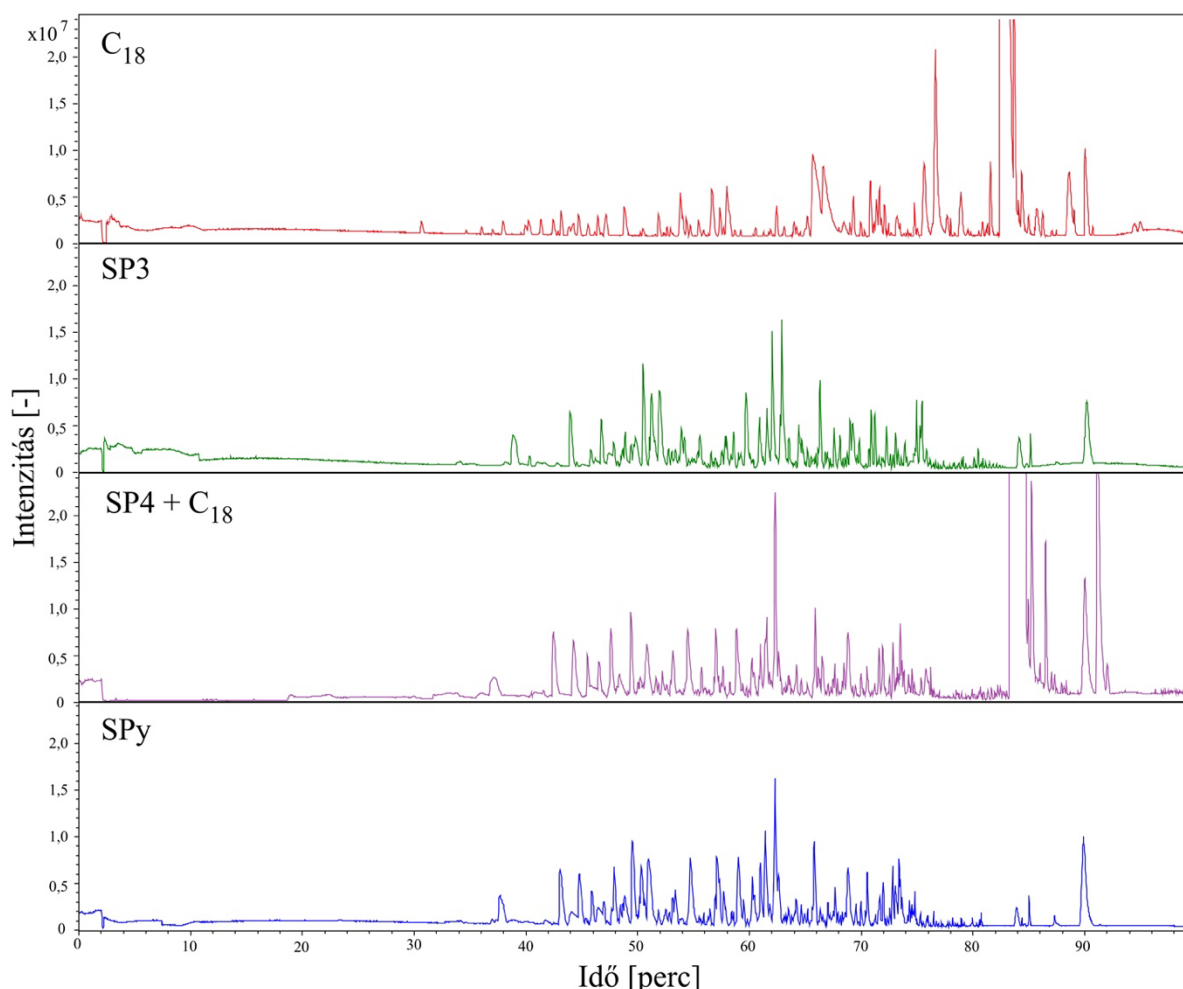
5.1. Kromatogramok tisztaságának jellemzése

Az első és legnyilvánvalóbb szempont, ami alapján a különböző mintaelőkészítési módszereket jellemezni lehet, az az, hogy milyen tiszta a minták kromatogramja. A vese sejtízátumminták peptidszintű tisztítása során kapott kromatogramokat a 11. ábrán, a fehérjeszintű tisztításokat a 12. ábrán mutatom be.



11. ábra: A különböző peptid tisztítási módszerekkel előkészített vese lizátumminták kromatogramja. C₁₈: standard protokoll; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökökön alapuló peptid tisztítási módszer.

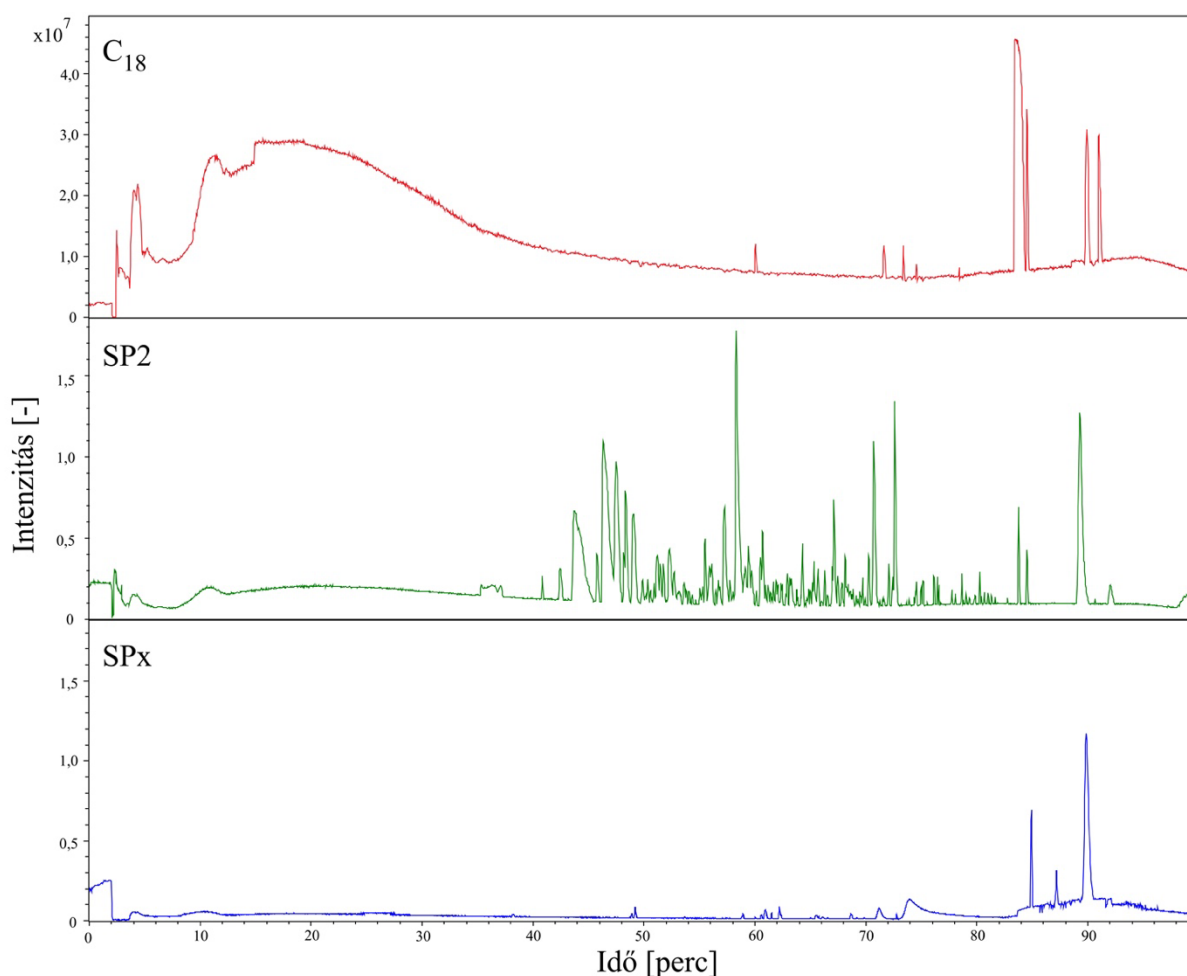
A 11. ábra alapján látható, hogy a referencia C_{18} módszerrel előkészített minta kromatogramjában a csúcsok már 30 perc körül megjelennek, az SP2 és SPx módszernél pedig 37 percnél jelennek meg az első csúcsok. A mintaelőkészítési módszerek közül az SP2 kromatogramján láthatóak a legintenzívebb jelek, míg az SPx minta kromatogramja a legkevésbé intenzív, illetve csúcsszegény. Ezek a megfigyelések korrelálnak az 5.2. fejezetben szereplő azonosított fehérjék és peptidek számával. A referenciamintának 85 percnél van egy nagyon intenzív szennyező csúcsa, illetve egy hasonló intenzitású szennyező csúcs az SP2 módszernél is megjelenik, viszont az SPx mintáknál a kromatogram végén nincsen jelentős szennyezés.



12. ábra: A különböző fehérje tisztítási módszerekkel előkészített vese lizátumminták kromatogramja. C_{18} : standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP4+ C_{18} : irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C_{18} tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló fehérje tisztítási módszer.

A 12. ábrán látható, hogy az SP3, SP4+ C_{18} és SPy módszerekkel előkészített minták kromatogramjai hasonlóak, csak apró különbségek láthatók, azonban mintázatuk jelentősen eltér a C_{18} tisztításon átesett minták kromatogramjától. Az SP3 háttéré a legnagyobb a kromatogramok közül (a grádiens elején, magas víztartalom mellett

tapasztalt háttér a kalibráló anyaggal összemérhető), illetve a legintenzívebb báziscsúcs intenzitása pedig kisebb, mint az SP4+C₁₈ módszerrel előkészített mintáknak. Megfigyelhető, hogy az SP4+C₁₈ tisztítás esetén is megjelent ugyanaz az intenzív szennyező csúcs, mint a C₁₈ módszernél. A 11. és 12. ábrák alapján azokat a következtetéseket vonhatjuk le, hogy a paramágneses gyöngyöket alkalmazó módszerekkel tisztább kromatogram kapható, valamint van olyan szennyező, amit csak ezekkel a módszerekkel lehet eltávolítani, a C₁₈ és SP4+C₁₈ protokollokkal viszont nem. Mivel a plazma- és szövetminták kromatogramjai alapján is hasonló következtetésekre lehet jutni, ezeket a függelék 9.1. pontjában mutatom be.

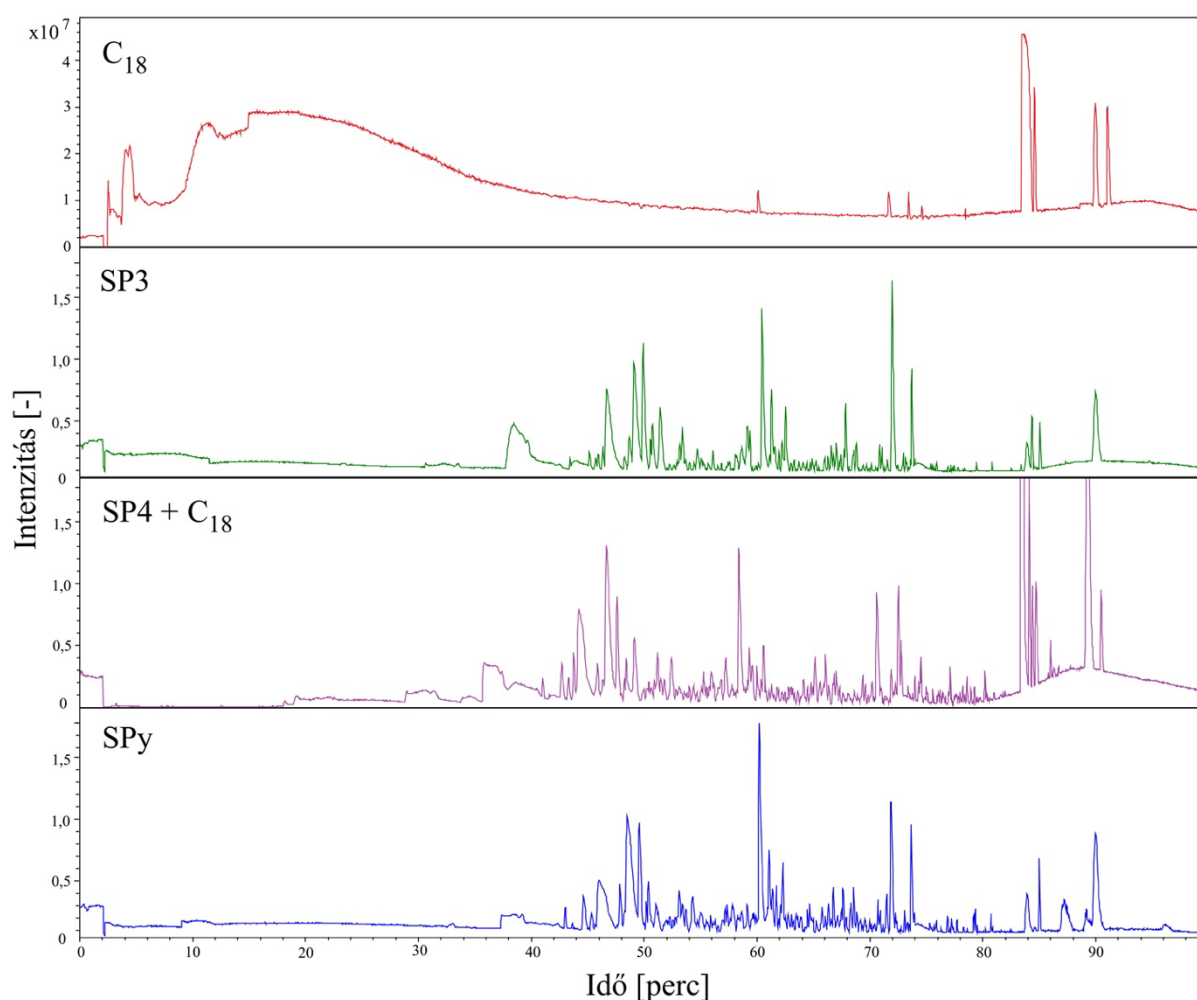


13. ábra: A különböző peptid tisztítási módszerekkel előkészített tüdő sejtmembránminták kromatogramja. C₁₈: standard protokoll; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökon alapuló peptid tisztítási módszer.

A membránminták kromatogramjai merőben különböznek a lizátumminták kromatogramjaitól. Még szélesebb intenzitás skála mellett is nagyon jelentős mértékű, a legtöbb csúcsot elnyomó háttérzavarás tapasztalható a C₁₈ mintánál, ennek ellenére nagyszámú peptidet és fehérjét voltam képes azonosítani a mérés alapján Byonic szoftverrel. Azonban ilyen nagy mennyiségű szennyező anyag elszennyezheti, vagy akár

tönkre is teheti a kromatográfiás oszlopot, ezzel legjobb esetben is zavarva a többi mérés sikerességét. A 13. ábrán látható, hogy az SPx minta kromatogramjának intenzitása elenyésző a másik két módszeréhez képest, ez a megfigyelés pedig korrelál a függelék 9.2. pontjában található F4. ábrán szereplő peptid- és fehérjeszámokkal.

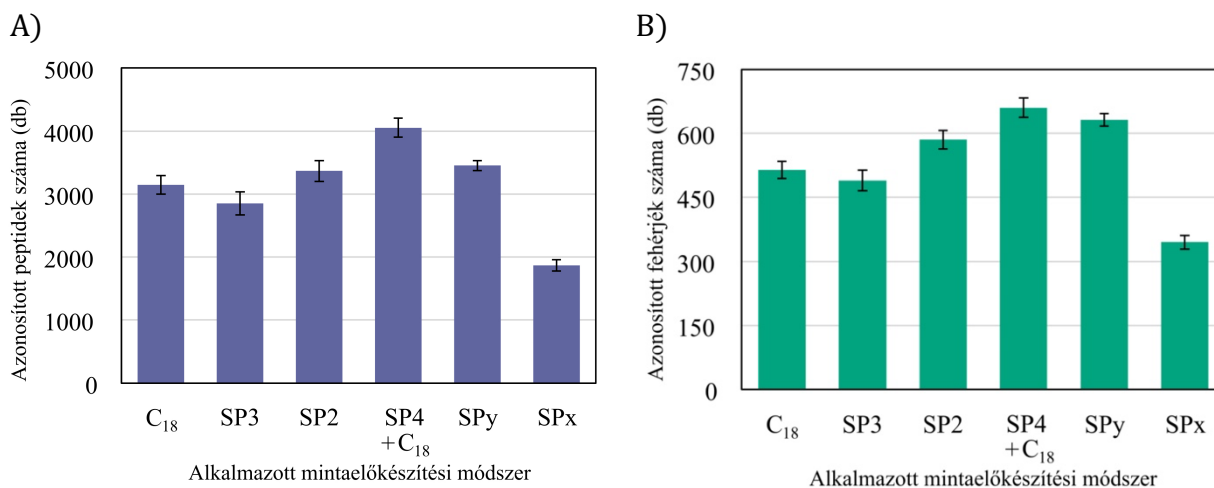
A 13. és 14. ábrákon látható, hogy egyik alternatív mintaelőkészítési módszer sem okozott akkora háttérrel, mint a C_{18} módszer. A 14. ábrán megfigyelhető továbbá, hogy az C_{18} és az SP4+ C_{18} protokollal előkészített minta kromatogramjának végén 85 percnél megjelenik egy nagyobb intenzitású szennyezés, ami a többi mintára nem volt jellemző. Az SP3, SP4+ C_{18} és SPy módszerek kromatogramjainak lefutása hasonló, azonban az intenzitásokban kisebb különbségeket lehet tapasztalni.



14. ábra: A különböző fehérje tisztítási módszerekkel előkészített tüdő sejtmembránminták kromatogramja. C_{18} : standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP4+ C_{18} : irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C_{18} tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló fehérje tisztítási módszer.

5.2. Összehasonlítás az azonosított peptidek és fehérjék száma alapján

A fejezetben részletesen bemutatam a lizátum- és plazmamintákból azonosított peptidek és fehérjék számát, és ezek Venn-diagrammos csoportosítását az előkészítési módok alapján. A membrán- és szövetminták eredményeit összefoglaló ábrák a függelék 9.2. pontjában található.

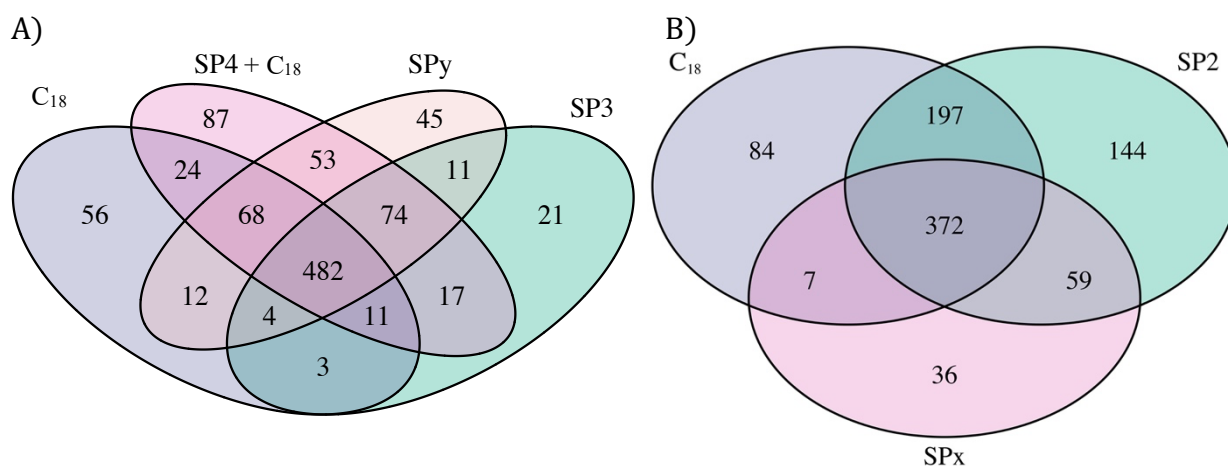


15. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített vese lizátummintákból azonosított peptidek (A) és fehérjék (B) száma. C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer. n = 3

Vese lizátumminták esetében az azonosított peptidek száma korrelál az azonosított fehérjék számával. Tehát minél több a peptid találat, annál több a fehérjék száma is (15. ábra). Az SP2, SP4+C₁₈ és SPy módszerekkel több fehérjét lehetett azonosítani, mint a standard mintaelőkészítési módszerrel (C₁₈). E mellett a saját fejlesztésű SPy protokollal több fehérjét és peptidet tudtam azonosítani, mint az SP3 és SP2 irodalmi módszerekkel. Az SP4+C₁₈ módszer a referencia C₁₈ módszerhez képest megközelítően 30%-kal több fehérjetalálatot eredményezett. Az azonosított fehérjék és peptidek számának szórása minden mintaelőkészítés során hasonló volt.

A 16. ábrán az egyes protokollokkal azonosított fehérjék módszerek közti megoszlása látható Venn-diagrammként ábrázolva. A diagram A részén látható, hogy a fehérje tisztítási módszerek (SP3, SP4+C₁₈, SPy és referencia (C₁₈)) esetében az összes fehérje több mint 50%-át azonosítani tudtam az összes módszerrel, a maradék eloszlása pedig egységes a különböző protokollok között, tehát nincs olyan kiemelkedően nagy fehérje szám, melyet kifejezetten csak az egyik, illetve csak a másik módszerrel lehetett volna azonosítani. A legtöbb egyedi fehérje azonosítását az SP4+C₁₈ tette lehetővé. A peptid tisztítási

módszerek esetében a fehérjék 40%-át volt képes az összes módszer azonosítani, azonban ebben az esetben jelentős számú egyedi fehérjét tudtam a C₁₈ és SP2 módszerekkel azonosítani. A 15. és 16. ábrákon is látszik, hogy az SPx mintaelőkészítéssel készített mintákból lényegesen kevesebb fehérjét lehetett kimutatni, ezt feltehetően az okozza, hogy a mintaelőkészítés során nagyobb veszteségek következtek be. A 15. és 16. ábrákon szereplő peptid- és fehérjeszámok különbözőek. Ennek oka az, hogy a 16. ábrán a három ismétlésben összesen szereplő egyedi fehérjék száma látható, míg a 15. ábrán az egy-egy mérésből átlagosan azonosított peptidek és fehérjék száma szerepel.

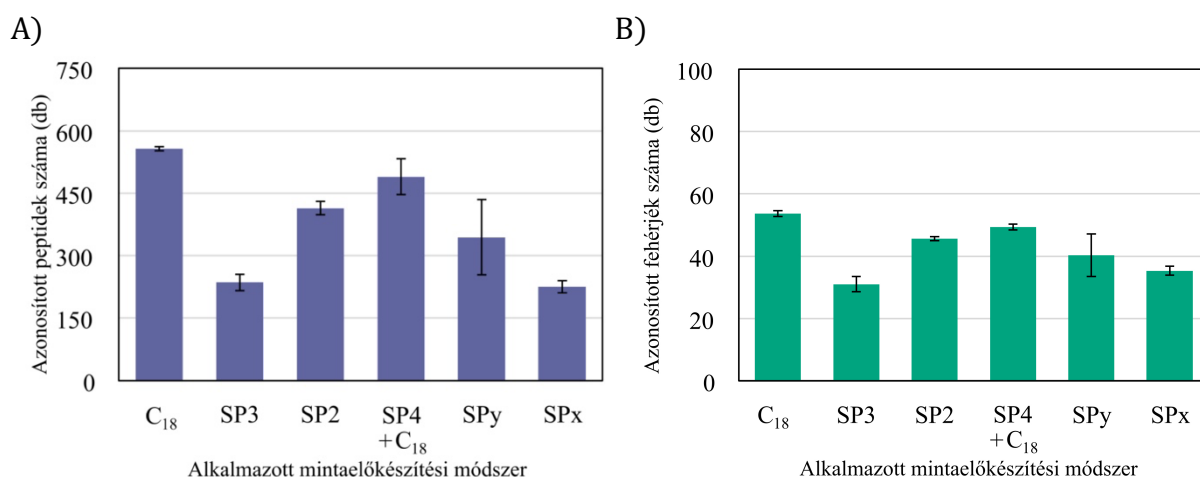


16. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített vese lizátummintákból azonosított fehérjék megoszlása. A) A fehérje tisztítási módszerekkel előkészített minták. B) A peptid tisztítási módszerekkel előkészített minták. C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer.

A tüdő sejtmembránminták eredményeiből (lásd: Függelék 9.2.) hasonló következtetéseket tudtam levonni, mint a lizátumminták alapján. A két mintatípus között azonos tendencia figyelhető meg az azonosított peptidek és fehérjék számának alakulásában. A legjelentősebb különbség a két minta között, hogy a membránminták esetében a saját fejlesztésű SPx módszerrel jelentősen kevesebb fehérjét lehetett azonosítani a többi módszerrel azonosított fehérjeszámhoz képest. A saját paramágneses gyöngyökön alapuló SPy módszerrel tisztított mintákból azonban nagyobb fehérje- és peptidszám volt elérhető, mint az irodalmi SP3 protokollal tisztítottakból.

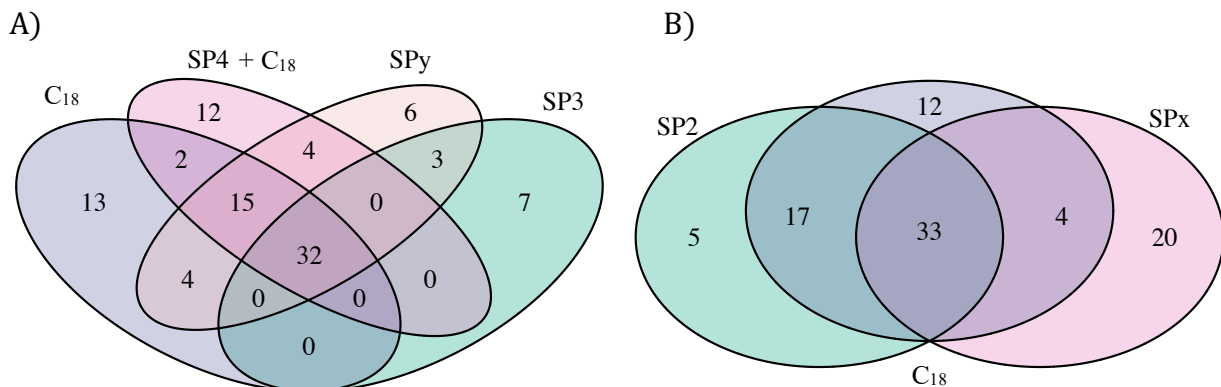
Az első lényeges különbség, ami megfigyelhető a vérplazma mintában (17. ábra), hogy egy nagyságrenddel kevesebb az azonosított peptidek és fehérjék száma, mint a vese sejtizátumban. Ennek oka, hogy a frakcionált vérplazmaminta kevésbé komplex összetételű. A plazmamintákból azonosított fehérjék és peptidek számának szórása egyes

esetekben akár 20%-os is volt. Ez alapján feltételezhető, hogy az adott módszernek rosszabb a reprodukálhatósága, mint a többié. Azonban ilyen kis mintaelemszámok esetén biztos következtetéseket nem lehet levonni a reprodukálhatóságra vonatkozóan. Ebben az esetben is azonos tendencia figyelhető meg a peptidek és fehérjék számának alakulásában, hasonlóan a lizátum és membránmintákhoz. Azonban a vérplazma esetében egyik alternatív mintaelőkészítési módszerrel sem voltam képes nagyobb fehérjeszámot elérni, mint az általánosan használt proteomikai módszerrel (C₁₈). Vérplazmaminták esetén a saját fejlesztésű SPy protokoll (30%-kal) mellett a szintén saját fejlesztésű SPx módszerrel (15%-kal), és az irodalmi SP4+C₁₈ és SP2 eljárásokkal (60 és 50%-kal) is több fehérjét tudtam azonosítani megbízhatóan, mint az irodalmi SP3 eljárással. Ezek alapján feltételezhető, hogy az SP3 a vérplazmát alkotó hidrofíl jellegű komponensekre nem működik optimálisan.



17. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített vérplazmamintákból azonosított peptidek (A) és fehérjék (B) száma. C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökon alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökon alapuló peptid tisztítási módszer. n = 3

Az azonosított fehérjék módszerenkénti eloszlását bemutató 18. ábra alapján az azonosított fehérjék 30%-a mindegyik módszerrel azonosításra került, valamint a nem minden módszerben azonosított fehérjék többnyire egyenletesen oszlottak meg a különböző csoportok kombinációi között.



18. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített vérplazmamintákból azonosított fehérjék megoszlása. A) A fehérje tisztítási módszerekkel előkészített minták. B) A peptid tisztítási módszerekkel előkészített minták. C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer.

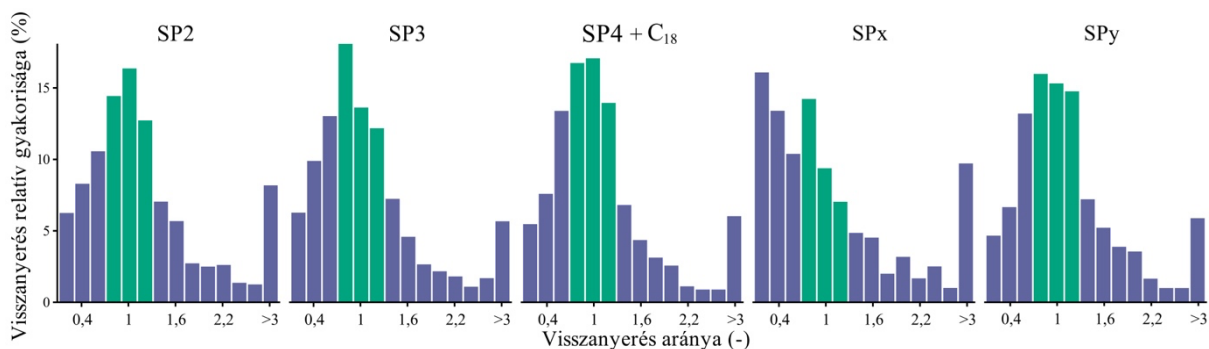
A prosztata szövetmintákon a szövetfelületi emésztés jellege miatt (a felületről peptideket extrahálunk) csak a C₁₈, SP2 és a saját SPx módszereket tudtam tesztelni. A szövetminták esetében jellemzően kevesebb peptidet és fehérjét lehetett azonosítani, mint a lizátum és membránmintáknál. A vérplazmamintákhoz hasonlóan a szövetből is a C₁₈ módszer segítségével tudtam a legtöbb peptidet azonosítani, ami a szövetminták esetében akár 45%-kal több peptid és fehérje azonosítását jelentette. Ezeknél a mintáknál a saját fejlesztésű SPx protokollal megközelítően annyi fehérjét lehetett azonosítani, mint az SP2 módszerrel.

Összességében a négy különböző mintafajtán végzett tesztek alapján megállapítható, hogy a lizátum és membránmintáknál az alternatív módszerekkel (SP4+C₁₈ és SPy) 20-30%-kal több fehérjét tudtam azonosítani. A plazma- és szövetminták esetében pedig minden esetben a referenciamódszerrel kaptam a nagyobb fehérjeszámot, viszont a saját fejlesztésű SPx módszer ezeknél már megközelítette az irodalmi módszerekkel (SP3, SP2) elért találatok számát. A saját fejlesztésű SPy módszerrel minden esetben több fehérje volt azonosítható, mint az SP3 eljárással, szövetminták esetében pedig közel azonos számú peptidet és fehérjét voltam képes azonosítani a saját fejlesztésű SPx módszerrel, mint az irodalmi SP2 protokollal.

5.3. Összehasonlítás relatív visszanyerés alapján

A vizsgált mintaelőkészítési módszereket elemeztem a relatív visszanyerésük alapján, melyet úgy számoltam ki, hogy a különböző módszerekkel előkészített mintákban mért fehérjeintenzitások átlagának és a hozzá tartozó referenciamintából (C₁₈) mért

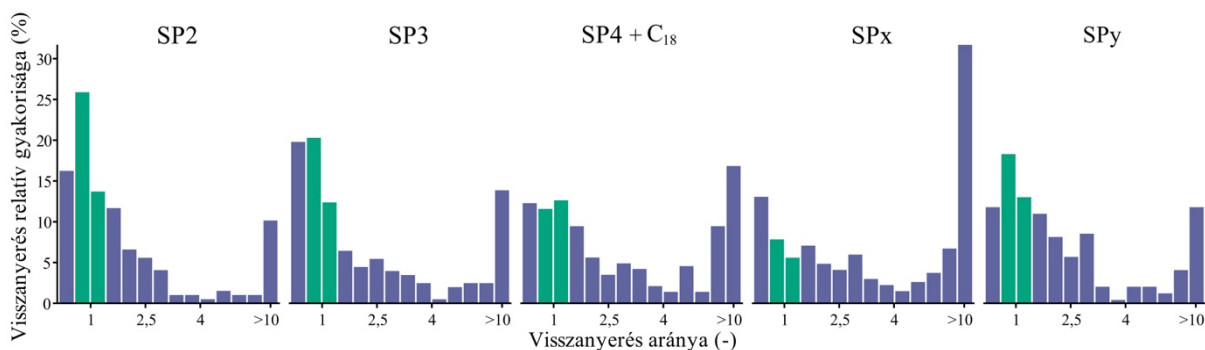
fehérjeintenzitások átlagának a hányadosát vettem. A kvantitatív proteomika szempontjából az az elvart, hogy a fehérjemintázat ne torzuljon, tehát a fehérjék minél nagyobb százaléka vegyen fel 1 körüli visszanyerés értéket. Amennyiben egy fehérje csak az alternatív módszerrel előkészített mintában fordult elő és a kontrollban nem, akkor a fehérje nem jelenik meg az alább szereplő diagramokon.



19. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített vese lizátumminták relatív visszanyerés hisztogramja. C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintelőkészítési módszer, C₁₈ tisztítással; SPy; saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer. Zöld színnel az ideális visszanyerési tartomány (0,8-1,2) van megjelölve.

A vese sejtlizátumminták relatív visszanyerés ábráján (19. ábra) látható, hogy az SPx módszer kivételével a hisztogramok maximuma 1-hez közeli visszanyerés értéknél van. Azonban nem jelenthető ki, hogy a különböző mintaelőkészítési módszerek nem torzítanak a referenciához képest, mivel a visszanyerések eloszlása meglehetősen széles, és az ideális visszanyerésű fehérjék aránya egyik esetben sem éri el az 50%-ot. Ezek alapján megállapítható, hogy minden módszer esetén nagy számban találhatók olyan fehérjék, melyek kisebb vagy éppen nagyobb intenzitással vannak jelen, mint a referenciában. A legkevesebb ideális visszanyerésű fehérjét az SPx esetén tapasztaltam, mivel ebben az esetben a fehérjék legnagyobb százaléka kisebb intenzitású, mint a referenciamintában. Hasonló következtetést lehet levonni a tüdő sejtmembránminták visszanyeréseiről, ezért az ezt ábrázoló diagram a függelék 9.3. pontjában található. A szövetminták visszanyerés hisztogramjának lefutása az előbbiekhöz hasonló, azonban maximuma eltolódott a 0,6-0,8-os visszanyerés arányok felé (lásd: függelék 9.3.)

A plazmaminták relatív visszanyerései esetében sokkal elnyúltabb a relatív visszanyerések eloszlása. Különösen nagy a torzítása az SPx mintaelőkészítési módszernek, ebben az esetben az azonosított fehérjék több mint 30%-ának 10 fölötti a visszanyerési aránya.



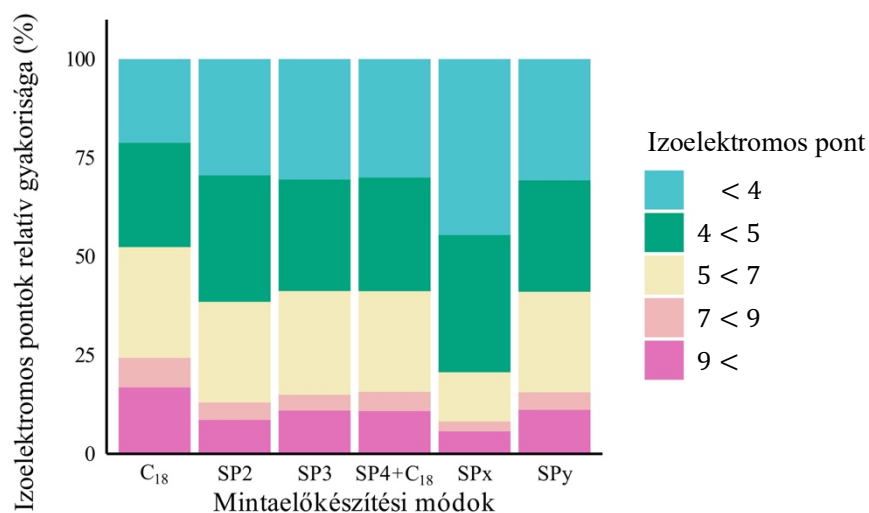
20. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített vérplazmaminták relatív visszanyerés hisztogramja. C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer. Zöld színnel az ideális visszanyerési tartomány (0,8-1,2) van megjelölve.

Összegzésként elmondható, hogy a lizátum-, membrán- és szövetminták esetében hasonló visszanyerési arányokat lehet kapni az SP3, SP2, SP4+C₁₈ és SPy módszerrel. Látható, hogy az SPx protokollal előkészített mintákból a lizátum-, membrán- és szövetminták esetében az azonosított fehérjék közel 40%-a kisebb intenzitással volt mérhető, mint a referencia, a plazma mintánál azonban a fehérjék 70%-a nagyobb intenzitású volt, mint a referencia. Ebből kifolyólag az SPx előkészítési módszernek a legnagyobb mértékű a torzítása. A vérplazmamintáknál a további mintákhoz képest még szélesebb eloszlása van fehérjék visszanyerésének, azonban ennél a mintatípusnál is az SPx módszer torzít a legjobban.

5.4. Összehasonlítás az azonosított peptidek izoelektromos pontja alapján

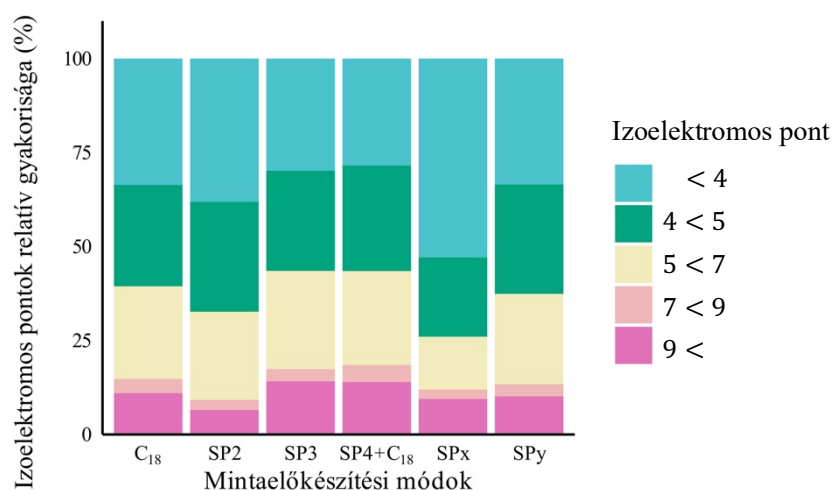
Kutatásom során vizsgáltam a különböző mintaelőkészítési módszerekkel azonosított peptidek izoelektromos pontját.

A vese sejtlizátummintákból (21. ábra) azonosított peptidek izoelektromos pontjainak eloszlása alapján látható, hogy az alkalmazott módszerek közül a referencia mintaelőkészítéssel lehetett a legnagyobb arányban bázikus izoelektromos ponttal rendelkező peptideket azonosítani, amely az összes azonosított peptid közel 25%-a. Megfigyelhető, hogy a saját fejlesztésű SPx módszer közel 50%-kal nagyobb mértékben dúsította az erősen savas (izoelektromos pont <4) peptideket, míg a referencia módszerben voltak ezek a legkevésbé dominánsak. A többi mintaelőkészítési eljárással (SP2, SP3, SP4+C₁₈ és SPy) azonosított peptidek izoelektromos pont eloszlása közel azonos, valamint ezek torzítottak a legkisebb mértékben a C₁₈ módszerhez képest.



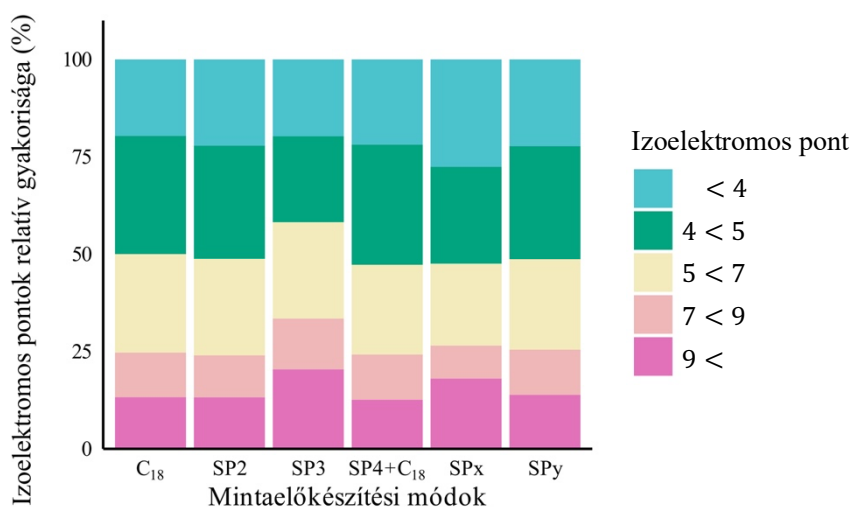
21. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített vese sejtizátummintákból azonosított peptidek izoelektromos pont szerinti eloszlása. C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer.

A tüdő sejtmembránminták izoelektromos pont eloszlása (22. ábra) alapján megállapítható, hogy a peptid tisztítási módszerek (SP2 és SPx) jobban dúsították a savas jellegű peptideket, és kisebb arányban szerepeltek ezekben a mintákban a bázikus izoelektromos ponttal rendelkező peptidek. A diagramon látható továbbá, hogy a bázikus peptideket a legnagyobb mértékben az SP4+C₁₈ mintaelőkészítési módszerrel lehetett azonosítani. A referenciához képest a SP3, SP4+C₁₈ és SPy mintaelőkészítések torzítanak a legkevésbé.

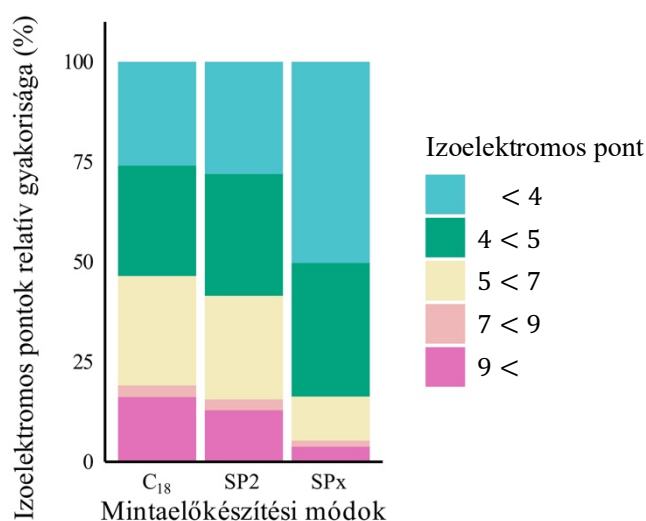


22. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített tüdő sejtmembránmintákból azonosított peptidek izoelektromos pont szerinti eloszlása. C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer.

Eltérő következtetések vonhatók le vérplazmamintából (23. ábra) azonosított peptidek izoelektromos pontjai alapján. Habár továbbra is az SPx módszer dúsította a legnagyobb mértékben az erősen savas izoelektromos ponttal rendelkező peptideket, azonban ez a különbség már nem annyira látványos, mint a lizátum és membránminták esetében. Ezek mellett megfigyelhető, hogy a plazmaminták nagyobb százalékban (25-30%) tartalmaznak bázikus izoelektromos pontú peptideket, amik az SP3 módszerrel dúsultak a legnagyobb mértékben. A referencia módszerhez képest az SP2, SP4+C₁₈ és SPy módszerek torzítottak a legkevésbé.



23. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített vérplazmamintákból azonosított peptidek izoelektromos pont szerinti eloszlása. C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer.



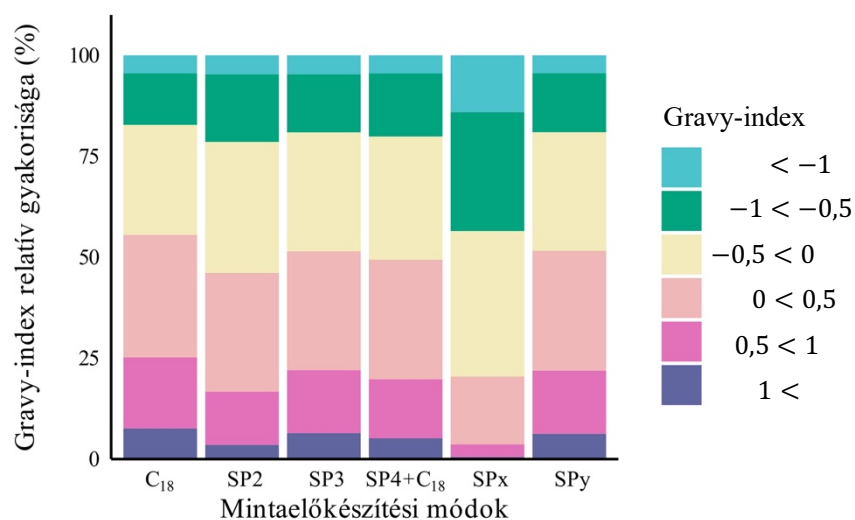
24. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített prosztatata szövetmintákból azonosított peptidek izoelektromos pont szerinti eloszlása. C₁₈: standard protokoll; SP2; irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer.

Amennyiben a prosztatata szövetmintákból (24. ábra) azonosított peptideket vizsgáljuk, azt tapasztalhatjuk, hogy ennél a mintánál a lizátum- és membránmintákhoz hasonlóan alakulnak az ábrán szemléltetett arányok. Megfigyelhető, hogy az SPx módszerrel azonosított erősen savas peptidek aránya a prosztatata szövetminták esetében is közel 50%, illetve az alternatív módszerek közül az SP2 torzított a legkevésbé a referencia C₁₈ módszerhez képest.

Az izoelektromos pontok vizsgálata alapján összességében kijelenthető, hogy minden esetben az SPx módszer dúsította a legnagyobb mértékben az erősen savas peptideket a referenciához képest. Azonban ehhez hasonló következtetést az erősen bázikus peptidek dúsításáról nem lehet levonni, mivel az minden mintatípus esetén változó volt. Az eredményeim alapján látható, hogy a legtöbb mintatípus esetében az SPy és az SP2 módszerek torzítása volt a legkisebb mértékű a C₁₈ módszerhez képest.

5.5. Összehasonlítás az azonosított peptidek hidrofilitása alapján

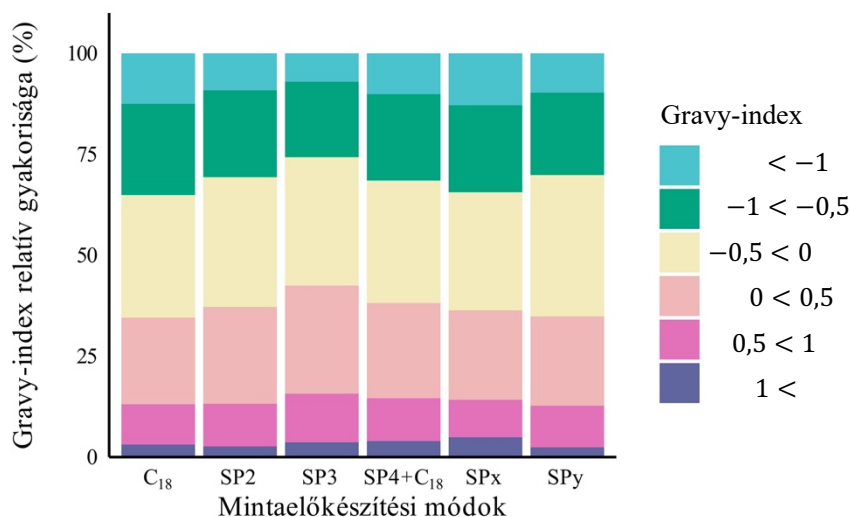
Kutatómunkám során összehasonlítottam a különböző mintaelőkészítési módszereket az általuk azonosított fehérjék hidrofilitása alapján is. Ezeket az eredményeket a vese sejt-lizátum- és a vérplazmaminták alapján mutatom be.



25. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített vese sejt lizátummintákból azonosított peptidek Gravy-index szerinti eloszlás ábrája. Hidrofil: negatív Gravy-index, Hidrofób: pozitív Gravy-index C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer, SP4 +C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökökön alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökökön alapuló peptid tisztítási módszer.

A 25. ábrán látható a lizátummintából azonosított fehérjék Gravy-index szerinti eloszlása, mely a fehérjék hidrofilitását jellemzi. Az ábra alapján egyértelműen látható, hogy az SPx módszer kivételével hasonló arányban sikerült azonosítani hidrofil (negatív

Gravy-index) és hidrofób (pozitív Gravy-index) peptideket. A C₁₈ módszerrel előkészített mintákból lehetett a legnagyobb arányban (közel 55%) hidrofób peptideket azonosítani. Ezek mellett látható, hogy alkalmazott mintaelőkészítési módszerek közül az SPx dúsította a legnagyobb mértékben a hidrofil jellegű peptideket. Mivel ugyanezeket a következtetéseket lehet levonni a tüdő sejtmembrán- és prosztata szövetminták alapján is, ezért ezeket itt nem részletezem bővebben, az ábrák a függelék 9.4. pontjában találhatók.



26. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített vérplazmamintákból azonosított peptidek Gravy-index szerinti eloszlás ábrája. Hidrofil: negatív Gravy-index, Hidrofób: pozitív Gravy-index C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökon alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökon alapuló peptid tisztítási módszer.

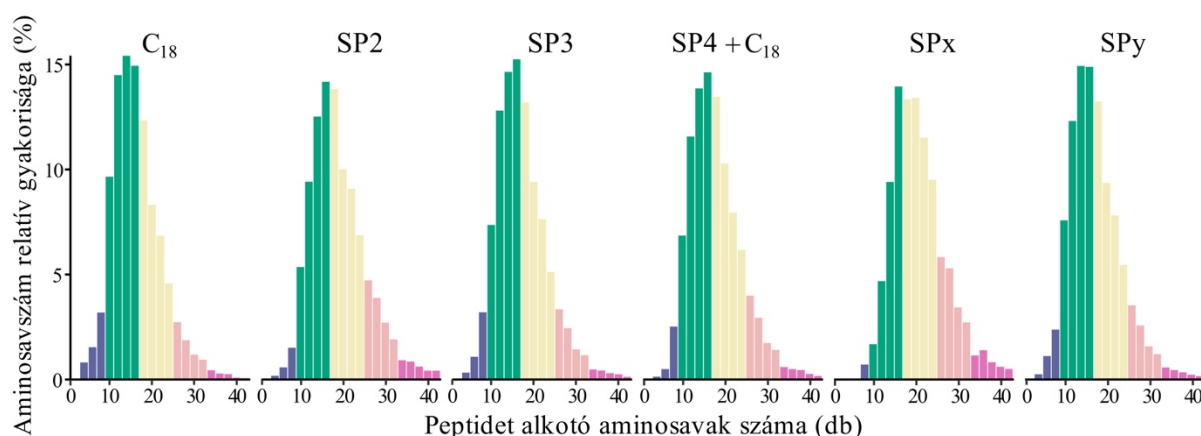
A vérplazmaminták hidrofilitás szerinti eloszlása különbözött a többi mintáétól. Amíg a másik három esetben az SPx módszer alkalmazásával jelentősen dúsultak a hidrofil komponensek, addig a plazmaminták esetében ez nem annyira jellegzetes. A 26. ábrán a módszerek között csupán kis különbségeket lehet tapasztalni. A C₁₈ módszerhez képest az alternatív mintaelőkészítési módszerek kevésbé dúsítják a hidrofil komponenseket, viszont jobban növelik a hidrofób komponensek arányát. Mindent összevetve hasonló hidrofilitás eloszlásokat lehet tapasztalni mindegyik mintaelőkészítési módszernél, azaz nem kell számolnunk jelentős torzulással a referenciamódszerhez képest.

Az azonosított peptidek hidrofilitás vizsgálatai alapján azt tapasztaltam, hogy a vese sejtizátum-, tüdő sejtmembrán- és prosztata szövetminták esetében az egyes módszerek közel megegyező a hidrofilitás eloszlást eredményeztek. Az SPx mintaelőkészítés nagymértékben dúsította a hidrofil peptideket, mindhárom esetben 75% körüli volt az arányuk. A hidrofób peptidek esetében az alternatív módszerekkel minden esetben kisebb

dúsulást tapasztaltam. Ezzel szemben a plazmamintáknál egyenletesebb hidrofilitás eloszlást lehetett tapasztalni, ez elsősorban a minta kisebb komplexitásával magyarázható. Összességében elmondható, hogy a lizátum, membrán és vérplazma mintatípusok esetén az SP4+C₁₈ és SPy módszerek torzítottak legkevésbé a referenciához képest. A prosztatata szövetminták esetében pedig az SP2 protokollnak volt a legkisebb mértékű torzítása.

5.6. Összehasonlítás az azonosított peptidek hossza alapján

Következő lépésben azt tanulmányoztam, hogy a mintaelőkészítési módszer hogyan befolyásolta az azonosított peptidek hosszát. A peptidek hosszát az őket alkotó aminosavak száma alapján határoztam meg, a bemutatott ábrákon a relatív gyakoriságuk jelenik meg.



27. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített vese sejt-lizátummintákból azonosított peptidek relatív méreteloszlása. C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer, SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer. A színek csak a szemléltetést segítik.

A vese sejt-lizátummintából azonosított peptidek peptidhosszának relatív eloszlását a 27. ábra szemlélteti. Az diagramon látható méreteloszlások hasonló lefutásúak az összes mintaelőkészítési módszer esetében, maximumuk 16-20 darab aminosav körüli. Látható, hogy az SP2 és SPx módszer jobban dúsította a több aminosavból álló peptideket, mint a többi módszer. Mivel a vizsgált módszerek közül ez a kettő peptidszintű tisztítási módszer, ezért ez a megfigyelés arra utal, hogy a rövidebb peptidek kevésbé kötődnek a mágneses gyöngyökhöz, így a tisztítási folyamat során elvesznek. A membrán-, plazma- és szövetminták peptidhossz eloszlás diagramjai a függelék 9.5. pontjában találhatók.

5.7. Az egyes módszerek általános értékelése

A következő fejezetben röviden értékelem az egyes módszereket a kivitelezésük szempontjából. A kutatásom motivációja az általánosan alkalmazott proteomikai mintaelőkészítési módszer helyettesítése, mivel az sok hátránnyal rendelkezik. Többek között sok lépésből áll, és többszöri szárazra párlásra van szükség, ami rendkívül időigényes és szelektív mintavesztést okozhat. Néhány minta esetében a kiindulási közeg az emésztést zavarja, ilyenkor az oldatban történő emésztés és a C_{18} mellett további mintaelőkészítési lépések is szükségesek. A kísérleteim során a lizátum referenciaminták voltak ilyenek, ahol az első lépés az etanolos kicsapás volt, ami egy nappal megnövelte a mintaelőkészítéshez szükséges időt. Maga a C_{18} tisztítási lépés is időigényes, nagyobb mintaszám esetében nem is kivitelezhető azok egyidejű tisztítása, mivel az egyszerre tisztítható minták számát korlátozza a rendelkezésre álló centrifuga mérete. Ellenben előnye, hogy néhány mintatípus (szövet, plazma) esetén ezzel a módszerrel lehetett a legtöbb fehérjét azonosítani.

A legtöbb általam vizsgált mintatípus esetében az SP4+ C_{18} módszerrel sikerült a legtöbb fehérjét azonosítani. Azonban előkísérleteim során azt tapasztaltam, hogy az irodalomban szereplő kijelentésekkel ellentétben nem mérhető egyből az SP4 protokollal tisztított minta, mivel a kromatogramban sok szennyező komponens is megfigyelhető volt, ezért szükséges azt C_{18} oszlopon is sómentesíteni. Egy másik nehézség, hogy a centrifugálási lépések után a felülúszó eltávolítása nem könnyű feladat, mivel kis mintamennyiségek esetében nem látható szabad szemmel a pellet, így az megbolygatható, ami ronthatja az előkészítés reprodukálhatóságát. A felsorolt okok miatt a mintaelőkészítési folyamat annyira bonyolult és hosszú, hogy használata gyakorlati szempontból nem feltétlenül érdemes.

Az SP3 módszer a legelterjedtebben alkalmazott paramágneses gyöngyöket használó mintaelőkészítési módszer. A protokoll kivitelezése egyszerű, könnyen reprodukálható és nem tartalmaz időigényes lépéseket. További előnye, hogy egyedi hardver nélkül robotizálható, ez pedig egyszerre akár száz minta előkészítését is lehetővé teszi. Mindezek ellenére egyik vizsgált minta esetében sem lehetett több fehérjét kimutatni vele a referencia módszerhez képest.

Az SP2 protokoll kivitelezését tekintve hasonlít az SP3 módszerhez. Kevesebb lépést tartalmaz, mivel a folyamat során csak egy tisztítási lépés van, míg az SP3 módszernél a gyöngyre rögzítés után háromszor kell a mintát tisztítani, ebből kifolyólag a minták

szennyezettek maradhatnak, ami káros a HPLC-MS/MS készülék szempontjából. Az előbbieket mellett még hátránya, hogy acetonitrilt használ szerves oldószerként, ami kevésbé költséghatékony és egészségre károsabb, mint az SP3 protokollnál alternatívaként használt etanol.

A saját fejlesztésű SPy és SPx módszereim hátrányai, hogy mindkét módszer tartalmaz centrifugálási lépéseket a tisztítások között, ezek pedig megnövelik a mintaelőkészítés idejét, továbbá az SPx a várakozásaim ellenére legtöbb esetben nem tudott versenybe lépni a többi módszerrel az azonosított fehérje számok tekintetében. Azonban az SPy protokollal minden esetben több fehérjét sikerült azonosítani, mint az irodalmi SP3 módszerrel, továbbá egyik saját tisztítási módszer után sem volt szükség további C₁₈ tisztítás elvégzésére.

6. Összefoglalás

A kutatómunkám alatt ötféle alternatív mintaelőkészítési módszert teszteltem négyféle humán eredetű minta proteomikai vizsgálata során. Az eredményeket az általánosan alkalmazott oldatban történő tripszines emésztési, majd C_{18} tisztítási protokollal vetettem össze.

Tanulmányoztam különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített minták kromatogramjának tisztaságát, mely során azt tapasztaltam, hogy az SP3, SP2, SPy és SPx módszerekkel lehetett a legtisztább kromatogramokat elérni. A módszereket értékeltem a mintákból azonosított peptidek és fehérjék száma alapján, valamint mintatípusonként vizsgáltam az azonosított fehérjék módszerek közti megoszlását. Ezek alapján a legtöbb fehérjét az SP4+ C_{18} mintaelőkészítés során sikerült azonosítani. A saját fejlesztésű SPy módszer minden esetben jobbnak bizonyult, mint az irodalmi SP3, és legtöbbször közel annyi fehérjét lehetett azonosítani ezekből a mintákból, mint az SP2 vagy SP4+ C_{18} protokollokkal előkészítettekben.

Jellemeztem az egyes fehérjék relatív visszanyerését a különböző mintaelőkészítések során, melynek maximuma jellemzően 1 körüli volt, azonban a visszanyerések eloszlása széles volt, ami arra utal, hogy az alternatív mintaelőkészítési módszerek mennyiségileg torzítanak a referencia protokollhoz képest (C_{18}).

Vizsgáltam az azonosított peptidek izoelektromos pontjainak és hidrofilitásának alakulását a különböző minták és mintaelőkészítések esetén. Az izoelektromos pontok vizsgálata során azt tapasztaltam, hogy míg a bázikus peptideket mintatípusonként más módszerek dúsították, addig az SPx mintaelőkészítés dúsította a savas peptideket a legjelentősebben minden esetben. Az alternatív módszerek közül az SPx okozta a legjelentősebb mértékű torzítást, míg az SPy és SP2 torzítása a legtöbb mintatípus esetén elhanyagolható volt. A lizátum-, membrán- és szövetmintáknál hasonló hidrofilitás eloszlást tapasztaltam. Ezeknél az SPx módszer nagymértékben dúsította a hidrophil peptideket, a plazmamintáknál pedig egyenletesebb hidrofilitás eloszlást lehetett tapasztalni. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottam, hogy az SP4+ C_{18} módszer, az irodalomban tett kijelentésekkel ellentétben nem alkalmas kiemelkedően a hidrofób peptidek tisztítására és dúsítására.

Vizsgáltam továbbá a módszerekkel azonosított peptidek hosszának eloszlását, ez alapján látszott, hogy az SPx módszer dúsította legjobban a hosszabb peptidek arányát a mintákban.

Ezután értékeltem az egyes mintaelőkészítési módszereket a kivitelezésük nehézsége szerint. A legtöbb fehérje jellemzően az SP4+C₁₈ módszerrel volt kimutatható, azonban az SP4+C₁₈ eljárás nagy hátránya, hogy C₁₈ tisztítás szükséges hozzá, hogy kellően tiszta legyen a vizsgált kromatogram, ezért használata gyakorlati szempontból nem javasolt

Az eredményeket összegezve a dolgozatban tárgyalt eljárások közül a saját fejlesztésű SPy módszer bizonyult optimálisnak a legtöbb biológiai minta proteomikai célú feldolgozására. Ez alapján a módszer nem csak egyszerűbb és költséghatékonyabb alternatívát kínál a hagyományos, oldatos emésztésen és C₁₈ tisztítási protokollon alapuló mintaelőkészítéshez képest, de hozzájárulhat bizonyos biológiai minták proteomjának részletesebb feltérképezéséhez, és a bennük lezajló sejtbiológiai/biokémiai folyamatok mélyebb megértéséhez. Tapasztalataim szerint ezek a módszerek releváns alternatívát jelenthetnek az oldatos emésztés és C₁₈ tisztítási protokollra, de fontos a különböző mintafajtákra való optimalizálásuk, mivel minden biológiai minta eltérő kihívást rejt magában.

7. Irodalomjegyzék

1. Csősz, É. *Bevezetés a Proteomikába*. (Semmelweis Kiadó, Budapest, 2023).
2. Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M. & Rasool, M. H. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci* **55**, 182–196 (2017).
3. Guo, X. & Kristal, B. S. The use of underloaded C18 solid-phase extraction plates increases reproducibility of analysis of tryptic peptides from unfractionated human plasma. *Anal Biochem* **426**, 86–90 (2012).
4. Johnston, H. E. *et al.* Solvent precipitation SP3 (SP4) enhances recovery for proteomics sample preparation without magnetic beads. *Anal Chem* **94**, 10320–10328 (2022).
5. Waas, M., Pereckas, M., Jones Lipinski, R. A., Ashwood, C. & Gundry, R. L. SP2: Rapid and Automatable Contaminant Removal from Peptide Samples for Proteomic Analyses. *J Proteome Res* **18**, 1644–1656 (2019).
6. Hughes, C. S. *et al.* Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nat Protoc* **14**, 68–85 (2019).
7. Hughes, C. S. *et al.* Ultrasensitive proteome analysis using paramagnetic bead technology. *Mol Syst Biol* **10**, 757 (2014).
8. Rabilloud, T. & Lelong, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *J Proteomics* **74**, 1829–1841 (2011).
9. Gordon, S. M., Deng, J., Lu, L. J. & Davidson, W. S. Proteomic characterization of human plasma high density lipoprotein fractionated by gel filtration chromatography. *J Proteome Res* **9**, 5239–5249 (2010).
10. Patton, W. F., Panchagnula, V., Rockney, E. & Krull, I. S. Taking a walk on the wild side with planar electrochromatography and thin-layer electrophoresis: of peptides, proteins, and proteomics. *J Liq Chromatogr Relat Technol* **29**, 1177–1218 (2006).
11. Shi, Y., Xiang, R., Horváth, C. & Wilkins, J. A. The role of liquid chromatography in proteomics. *J Chromatogr A* **1053**, 27–36 (2004).
12. Neverova, I. & Van Eyk, J. E. Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. *Journal of Chromatography B* **815**, 51–63 (2005).
13. Lobas, A. A., Verenchikov, A. N., Goloborodko, A. A., Levitsky, L. I. & Gorshkov, M. V. Combination of Edman degradation of peptides with liquid chromatography/mass spectrometry workflow for peptide identification in bottom-up proteomics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **27**, 391–400 (2013).
14. Aebersold, R. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198–207 (2003).
15. Han, X., Aslanian, A. & Yates III, J. R. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol* **12**, 483–490 (2008).
16. Niall, H. D. Automated edman degradation: The protein sequenator. in *Methods in enzymology* vol. 27 942–1010 (Elsevier, 1973).
17. Wang, Y., Sun, J., Qiao, J., Ouyang, J. & Na, N. A. A “soft” and “hard” ionization method for comprehensive studies of molecules. *Anal Chem* **90**, 14095–14099 (2018).
18. Schaumlöffel, D. New ways in qualitative and quantitative protein analysis: nano chromatography coupled to element mass spectrometry. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **21**, 18–22 (2007).
19. Li, W. & Tse, F. L. S. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomedical Chromatography* **24**, 49–65 (2010).
20. Shen, B. *et al.* Capillary electrophoresis mass spectrometry for scalable single-cell proteomics. *Front Chem* **10**, 863979 (2022).

21. Balbisi, M. *et al.* Inter- and intratumoral proteomics and glycosaminoglycan characterization of ALK rearranged lung adenocarcinoma tissues: a pilot study. *Sci Rep* **13**, 6268 (2023).
22. Bugyi, F., Tóth, G., Kovács, K. B., Drahos, L. & Turiák, L. Comparison of solid-phase extraction methods for efficient purification of phosphopeptides with low sample amounts. *J Chromatogr A* **1685**, 463597 (2022).
23. Hegyesi, H. *et al.* Circulating cardiomyocyte-derived extracellular vesicles reflect cardiac injury during systemic inflammatory response syndrome in mice. *Cellular and Molecular Life Sciences* **79**, 84 (2022).
24. Al-Amrani, S., Al-Jabri, Z., Al-Zaabi, A., Alshekaili, J. & Al-Khabori, M. Proteomics: Concepts and applications in human medicine. *World J Biol Chem* **12**, 57 (2021).
25. Ghose, A. *et al.* Applications of proteomics in ovarian cancer: dawn of a new era. *Proteomes* **10**, 16 (2022).
26. Ding, Z., Wang, N., Ji, N. & Chen, Z.-S. Proteomics technologies for cancer liquid biopsies. *Mol Cancer* **21**, 53 (2022).
27. Meissner, F., Geddes-McAlister, J., Mann, M. & Bantscheff, M. The emerging role of mass spectrometry-based proteomics in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **21**, 637–654 (2022).
28. Majumdar, S. & Keller, A. A. Omics to address the opportunities and challenges of nanotechnology in agriculture. *Crit Rev Environ Sci Technol* **51**, 2595–2636 (2021).
29. Zaghlool, S. B. *et al.* Epigenetics meets proteomics in an epigenome-wide association study with circulating blood plasma protein traits. *Nat Commun* **11**, 15 (2020).
30. Petelski, A. A. *et al.* Multiplexed single-cell proteomics using SCoPE2. *Nat Protoc* **16**, 5398–5425 (2021).
31. Sugár, S. *et al.* Alterations in protein expression and site-specific N-glycosylation of prostate cancer tissues. *Sci Rep* **11**, 15886 (2021).
32. Wichmann, T. O. *et al.* Cerebrospinal fluid and peripheral blood proteomics in traumatic spinal cord injury: a prospective pilot study. *Brain & Spine* **2**, (2022).
33. Pappa, E., Vougas, K., Zoidakis, J. & Vastardis, H. Proteomic advances in salivary diagnostics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* **1868**, 140494 (2020).
34. Muratore, C., Espen, L. & Prinsi, B. Nitrogen uptake in plants: the plasma membrane root transport systems from a physiological and proteomic perspective. *Plants* **10**, 681 (2021).
35. Catherman, A. D., Skinner, O. S. & Kelleher, N. L. Top Down proteomics: Facts and perspectives. *Biochem Biophys Res Commun* **445**, 683–693 (2014).
36. Switzar, L., Giera, M. & Niessen, W. M. A. Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments. *J Proteome Res* **12**, 1067–1077 (2013).
37. Sielaff, M. *et al.* Evaluation of FASP, SP3 and iST Protocols for Proteomic Sample Preparation in the Low Microgram Range. *J Proteome Res* **16**, (2017).
38. Carvalho, L. B., Capelo-Martínez, J.-L., Lodeiro, C., Wiśniewski, J. R. & Santos, H. M. Ultrasonic-Based Filter Aided Sample Preparation as the General Method to Sample Preparation in Proteomics. *Anal Chem* **92**, 9164–9171 (2020).
39. Dupree, E. J. *et al.* A critical review of bottom-up proteomics: the good, the bad, and the future of this field. *Proteomes* **8**, 14 (2020).
40. Miller, R. M. & Smith, L. M. Overview and considerations in bottom-up proteomics. *Analyst* **148**, 475–486 (2023).
41. Tsiatsiani, L. & Heck, A. J. R. Proteomics beyond trypsin. *FEBS J* **282**, 2612–2626 (2015).

42. Mann, M. & Jensen, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* **21**, 255–261 (2003).
43. Brown, K. A., Melby, J. A., Roberts, D. S. & Ge, Y. Top-down proteomics: challenges, innovations, and applications in basic and clinical research. *Expert Rev Proteomics* **17**, 719–733 (2020).
44. Coradin, M. *et al.* Bullet points to evaluate the performance of the middle-down proteomics workflow for histone modification analysis. *Methods* **184**, 86–92 (2020).
45. von Hagen, J. *Proteomics Sample Preparation*. (John Wiley & Sons, 2008).
46. Chandramouli, K. & Qian, P.-Y. Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Hum Genomics Proteomics* **2009**, (2009).
47. Switzar, L., van Angeren, J., Pinkse, M., Kool, J. & Niessen, W. M. A. A high-throughput sample preparation method for cellular proteomics using 96-well filter plates. *Proteomics* **13**, 2980–2983 (2013).
48. Kano, K. *et al.* Freeze-thaw effect on the solubilization of hydrophobic compounds in micelles and artificial bilayer membranes. *J Phys Chem* **88**, 5087–5092 (1984).
49. Chaifarit, S. & Thongboonkerd, V. Comparative analyses of cell disruption methods for mitochondrial isolation in high-throughput proteomics study. *Anal Biochem* **394**, 249–258 (2009).
50. Morsa, D. *et al.* Multi-Enzymatic Limited Digestion: The Next-Generation Sequencing for Proteomics? *J Proteome Res* **18**, 2501–2513 (2019).
51. Hodge, K., Ten Have, S., Hutton, L. & Lamond, A. I. Cleaning up the masses: exclusion lists to reduce contamination with HPLC-MS/MS. *J Proteomics* **88**, 92–103 (2013).
52. Tubaon, R. M., Haddad, P. R. & Quirino, J. P. Sample clean-up strategies for ESI mass spectrometry applications in bottom-up proteomics: Trends from 2012 to 2016. *Proteomics* **17**, 1700011 (2017).
53. Cañas, B., López-Ferrer, D., Ramos-Fernández, A., Camafeita, E. & Calvo, E. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomics* **4**, 295–320 (2006).
54. Gómez, M. J., Petrović, M., Fernández-Alba, A. R. & Barceló, D. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *J Chromatogr A* **1114**, 224–233 (2006).
55. Bugyi, F., Turiák, L., Drahos, L. & Tóth, G. Optimization of reversed-phase solid-phase extraction for shotgun proteomics analysis. *Journal of Mass Spectrometry* **58**, e4965 (2023).
56. Alpert, A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr A* **499**, 177–196 (1990).
57. Nagala, M. *et al.* Expression of Siglec-E alters the proteome of lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages but does not affect LPS-driven cytokine production or toll-like receptor 4 endocytosis. *Front Immunol* **8**, 323063 (2018).
58. Hughes, C. S. *et al.* Quantitative profiling of single formalin fixed tumour sections: proteomics for translational research. *Sci Rep* **6**, 34949 (2016).
59. Owen, D. R. *et al.* Molecular characterization of ERBB2-amplified colorectal cancer identifies potential mechanisms of resistance to targeted therapies: a report of two instructive cases. *Molecular Case Studies* **4**, a002535 (2018).
60. Åhrman, E. *et al.* Quantitative proteomic characterization of the lung extracellular matrix in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *J Proteomics* **189**, 23–33 (2018).

61. Larsbrink, J. *et al.* Proteomic insights into mannan degradation and protein secretion by the forest floor bacterium *Chitinophaga pinensis*. *J Proteomics* **156**, 63–74 (2017).
62. Larsbrink, J. *et al.* Proteomic data on enzyme secretion and activity in the bacterium *Chitinophaga pinensis*. *Data Brief* **11**, 484–490 (2017).
63. Mikulášek, K. *et al.* SP3 protocol for proteomic plant sample preparation prior LC-MS/MS. *Front Plant Sci* **12**, 635550 (2021).
64. Moggridge, S., Sorensen, P. H., Morin, G. B. & Hughes, C. S. Extending the compatibility of the SP3 paramagnetic bead processing approach for proteomics. *J Proteome Res* **17**, 1730–1740 (2018).
65. Smith, I. *Chromatography*. (Elsevier, 2013).
66. Walls, D., Loughran, S. T., Madadlou, A., O'Sullivan, S. & Sheehan, D. *Protein Chromatography*. (Springer, 2017).
67. Ballschmiter, K. & Wößner, M. Recent developments in adsorption liquid chromatography (NP-HPLC) A review: A review. *Fresenius J Anal Chem* **361**, 743–755 (1998).
68. Kumar, S. D. & Kumar, D. R. H. Importance of RP-HPLC in analytical method development: a review. *Int J Pharm Sci Res* **3**, 4626 (2012).
69. Studzińska, S., Pietrzak, L. & Buszewski, B. The effects of stationary phases on retention and selectivity of oligonucleotides in IP-RP-HPLC. *Chromatographia* **77**, 1589–1596 (2014).
70. Dejaegher, B. & Vander Heyden, Y. HILIC methods in pharmaceutical analysis. *J Sep Sci* **33**, 698–715 (2010).
71. Ochoa, J.-L. Hydrophobic (interaction) chromatography. *Biochimie* **60**, 1–15 (1978).
72. Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J.-L. & Guilleme, D. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal* **113**, 43–55 (2015).
73. Yates, J. R., Ruse, C. I. & Nakorchevsky, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng* **11**, 49–79 (2009).
74. Rodríguez-Suárez, E. & Whetton, A. D. The application of quantification techniques in proteomics for biomedical research. *Mass Spectrom Rev* **32**, 1–26 (2013).
75. Haag, A. M. Mass analyzers and mass spectrometers. *Modern proteomics—Sample preparation, analysis and practical applications* 157–169 (2016).
76. De Hoffmann, E. & Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. (John Wiley & Sons, 2007).
77. de Hoffmann, E. Tandem mass spectrometry: a primer. *Journal of mass spectrometry* **31**, 129–137 (1996).
78. McLafferty, F. W. Tandem mass spectrometry. *Science (1979)* **214**, 280–287 (1981).
79. Sinitcyn, P., Rudolph, J. D. & Cox, J. Computational methods for understanding mass spectrometry-based shotgun proteomics data. *Annu Rev Biomed Data Sci* **1**, 207–234 (2018).
80. Hebert, A. S. *et al.* Improved precursor characterization for data-dependent mass spectrometry. *Anal Chem* **90**, 2333–2340 (2018).
81. Doerr, A. DIA mass spectrometry. *Nat Methods* **12**, 35 (2015).
82. Gevaert, K. & Vandekerckhove, J. Protein identification methods in proteomics. *ELECTROPHORESIS: An International Journal* **21**, 1145–1154 (2000).
83. Olsen, J. V & Mann, M. Improved peptide identification in proteomics by two consecutive stages of mass spectrometric fragmentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 13417–13422 (2004).

84. Geiger, T., Cox, J. & Mann, M. Proteomics on an Orbitrap benchtop mass spectrometer using all-ion fragmentation. *Molecular & Cellular Proteomics* **9**, 2252–2261 (2010).
85. Guthals, A. & Bandeira, N. Peptide identification by tandem mass spectrometry with alternate fragmentation modes. *Molecular & Cellular Proteomics* **11**, 550–557 (2012).
86. Chahrour, O., Cobice, D. & Malone, J. Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. *J Pharm Biomed Anal* **113**, 2–20 (2015).
87. Schubert, O. T., Röst, H. L., Collins, B. C., Rosenberger, G. & Aebersold, R. Quantitative proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research. *Nat Protoc* **12**, 1289–1294 (2017).
88. Righetti, P. G., Campostrini, N., Pascali, J., Hamdan, M. & Astner, H. Quantitative proteomics: a review of different methodologies. *European Journal of Mass Spectrometry* **10**, 335–348 (2004).
89. Wilm, M. Quantitative proteomics in biological research. *Proteomics* **9**, 4590–4605 (2009).
90. Koh, H. W. L. *et al.* EBprot: Statistical analysis of labeling-based quantitative proteomics data. *Proteomics* **15**, 2580–2591 (2015).
91. Osorio, D., Rondón-Villarreal, P. & Torres, R. Peptides: a package for data mining of antimicrobial peptides. *R J* **7**, 4–14 (2015).

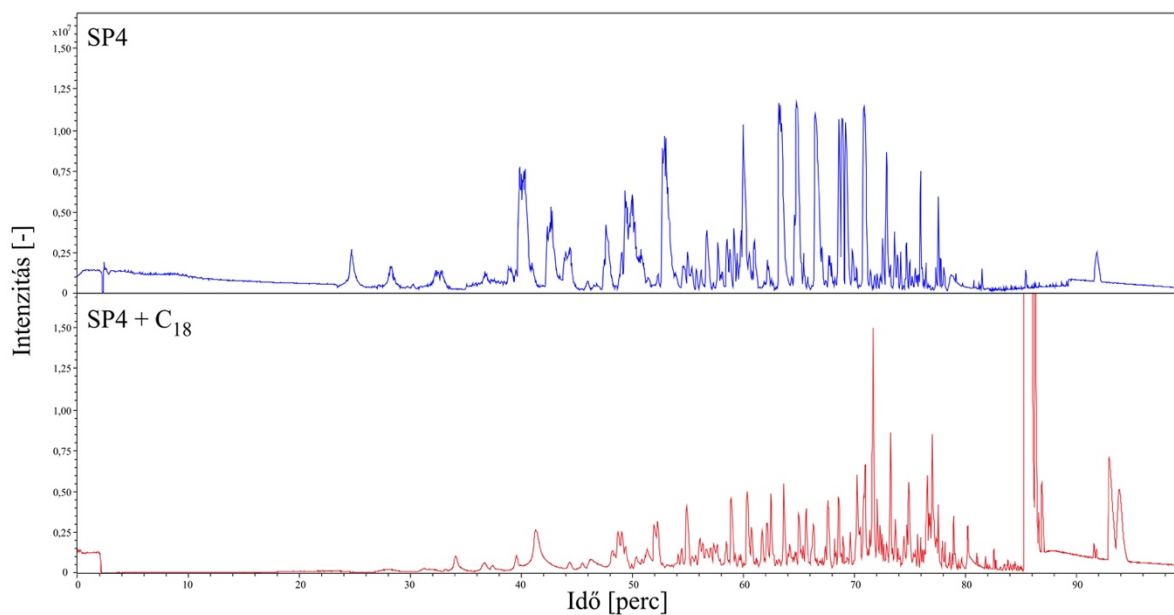
8. Rövidítés jegyzék

ABC:	ammónium-bikarbonát
ACN:	acetonitril
CID:	<i>Collision Induced Dissociation</i> , ütközés indukált disszociáció
DDA:	<i>Data Dependent Analysis</i> , adatfüggő adatgyűjtési technika
DIA:	<i>Data Independent Analysis</i> , adatfüggetlen adatgyűjtési technika
DTT:	ditiotreitol
ESI:	<i>Electrospray Ionization</i> , elektroporlasztásos ionizáció
EtOH:	etil-alkohol
FA:	hangyasav
FAB:	<i>Fast Atom Bombardment</i> , gyors atom bombázás
FDR:	<i>False Discovery Rate</i> , hamis találatok aránya
FFPE:	<i>Formalin-fixed Paraffin Embedded</i> , formalinnal rögzített paraffinba ágyazott
H ₂ O:	víz
HILIC:	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i> , hidrofil kölcsönhatási kromatográfia
HIC:	<i>Hydrophobic Interaction Chromatography</i> , hidrofób kölcsönhatási kromatográfia
HPLC:	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
IAA:	jód-acetamid
IEC:	<i>Ion Exchange Chromatography</i> , ioncserés kromatográfia
LC:	<i>Liquid Chromatography</i> , folyadékkromatográfia
m:	tömeg
MA:	Massachusetts Állam
MALDI:	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i> , mátrixszal segített lézer deszorpciós ionizáció
MO:	Missouri Állam
MS:	<i>Mass Spectrometry</i> , tömegspektrometria
nanoESI:	<i>Nano Electrospray Ionization</i> , nano-elektroporlasztásos ionizáció
NP-HPLC:	<i>Normal Phase High Performance Liquid Chromatography</i> , normál fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
PA:	Pennsylvania Állam
PEG:	poli(etilén-glikol)
R:	felbontás
RP-HPLC:	<i>Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography</i> , fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia

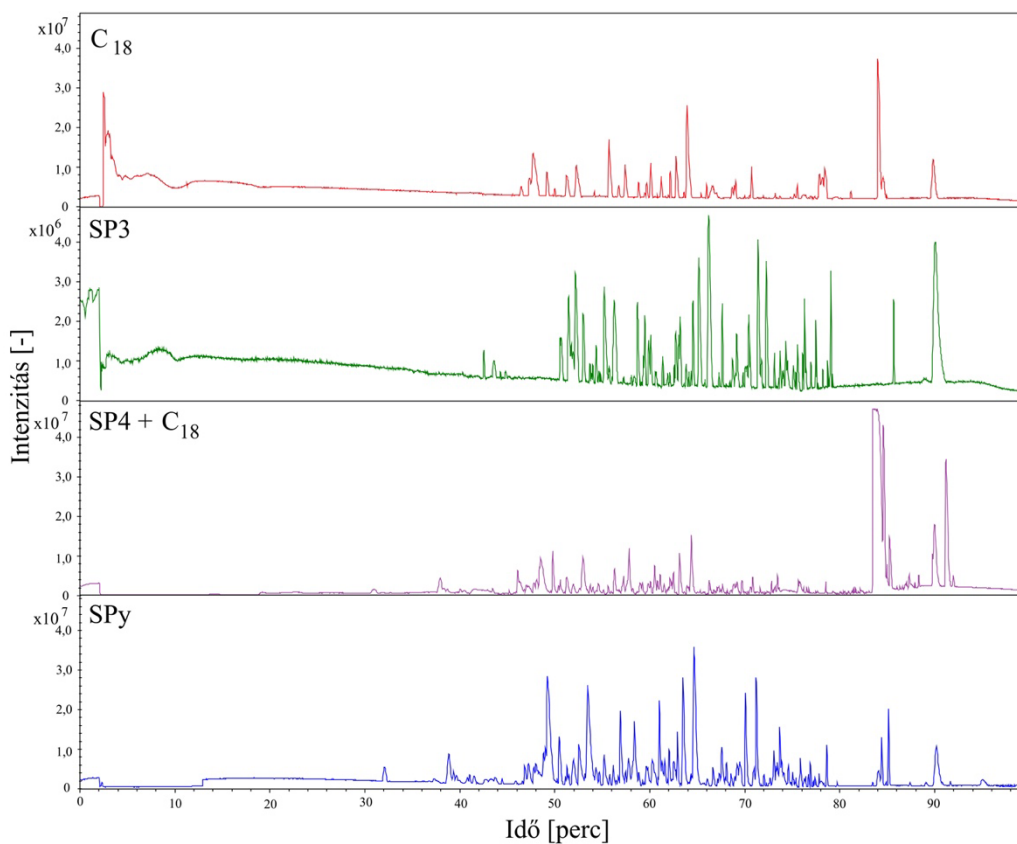
RP-IP-HPLC:	<i>Reversed Phase Ion Pair High Performance Liquid Chromatography</i> , fordított fázisú ionpár kromatográfia
SDS-PAGE:	<i>Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> , nátrium-dodecil-szulfát poli(akrilamid) gélelektroforézis
SIMS:	<i>Secondary Ionization Mass Spectrometry</i> , másodlagos ionizációs tömegspektrometria
SP2:	<i>Solid Phase-enhanced Sample Purification</i> , Szilárd fázissal segített mintatisztítás
SP3:	<i>Single-Pot, Solid-Phase-enhanced Sample Preparation</i> , egy-edényes, szilárd fázissal segített mintaelőkészítés
SP4:	<i>Solvent Precipitation, Single-Pot, Solid-Phase-enhanced Sample Preparation</i> , egy-edényes, oldószeres kicsapással és szilárd fázissal segített mintaelőkészítés
SPE:	<i>Solid Phase Extraction</i> , szilárd fázisú extrakció
TFA:	trifluor-ecetsav
USA:	<i>United States of America</i> , Amerikai Egyesült Államok
WI:	Wisconsin Állam
z:	töltés

9. Függelék

9.1. Kromatogramok tisztasága



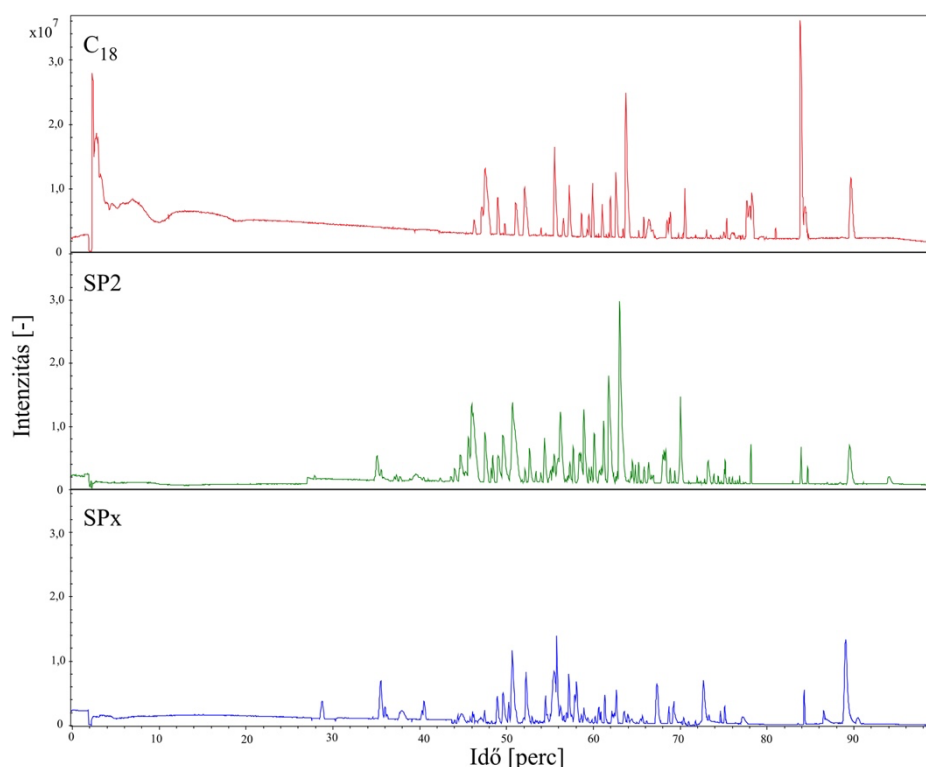
F1. ábra: Előkísérletek során SP4 és SP4+C₁₈ módszerrel előkészített vese sejtizátumminták kromatogramja. SP4: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló tisztítási módszer, C₁₈: C₁₈ SPE oszlopon végzett tisztítás



F2. ábra: A különböző fehérje tisztítási módszerekkel előkészített vérplazmaminták kromatogramja. C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökon alapuló fehérje tisztítási módszer. A kromatogramok y-tengelyének skálázása eltérő.

Az F1. ábra alapján látható, hogy szükség volt az SP4 minták C₁₈ tisztítására, mivel anélkül nagyobb háttérzavarást (a kalibrálóval összevethető mértékű), és fokozottabb csúcs szélesedést lehet tapasztalni.

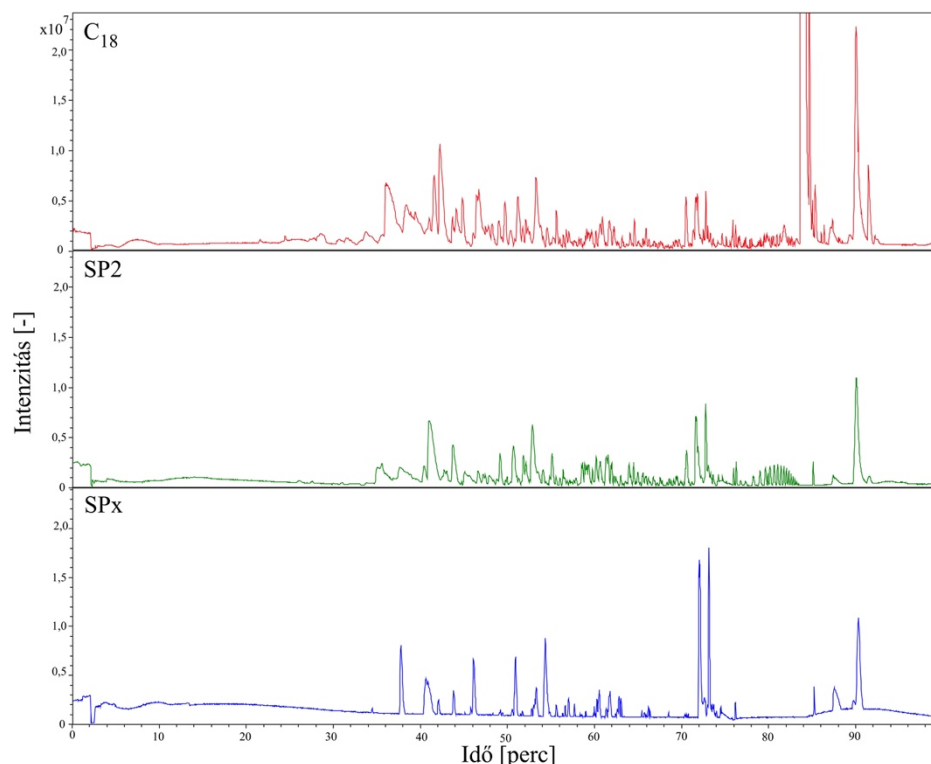
Az F2. ábrán látható, hogy az SP3 minta kromatogramjának egy nagyságrenddel kisebb az intenzitása, ezért az intenzitás skáláját is egy nagyságrenddel csökkenteni kellett, hogy elemezhető legyen a kromatogram. A C₁₈ módszerrel előkészített minták háttere nagy a többi módszerhez képest, és a vérplazmaminták esetében is megfigyelhető a PEG szennyezés a C₁₈ és SP4 protokolloknál 85 percnél.



F3. ábra: A különböző peptid tisztítási módszerekkel előkészített vérplazmaminták kromatogramja. C₁₈: standard protokoll; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökon alapuló peptid tisztítási módszer.

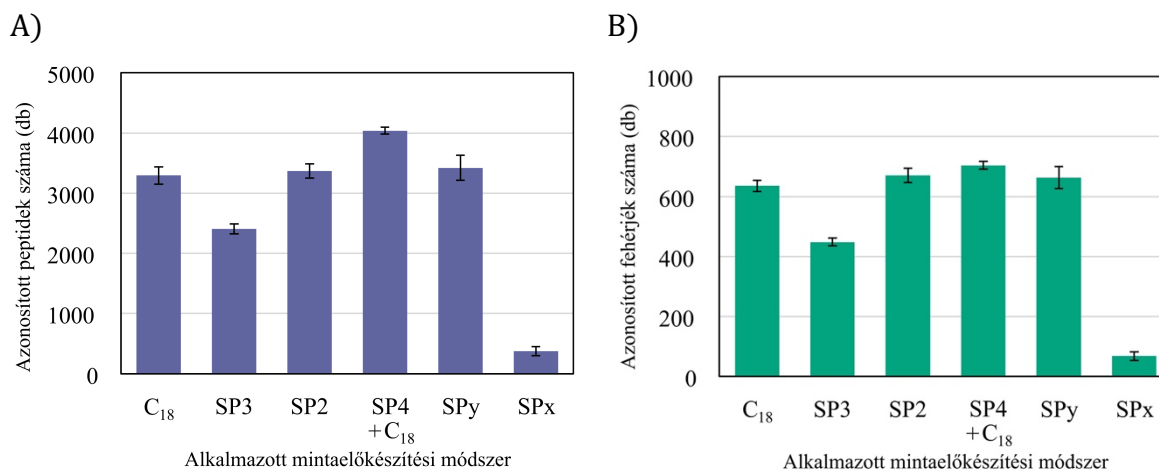
Az F3. ábrán szereplő SPx kromatogramnak jelentősen kisebb az intenzitása, mint az SP2 és C₁₈ mintáknak, azonban az F1. és F2. ábrákat összevetve látható, hogy még így is intenzívebbek a csúcsok, mint az SP3 minták esetében. Ezek a megfigyelések összhangban vannak az 5.2. fejezetben szereplő peptid- és fehérjeszámokkal.

A szövetminták (F4. ábra) esetében is látható az intenzív PEG szennyezés a C₁₈ mintánál, továbbá megfigyelhető, hogy a C₁₈ kromatogram csúcsokban gazdagabb és intenzívebb.

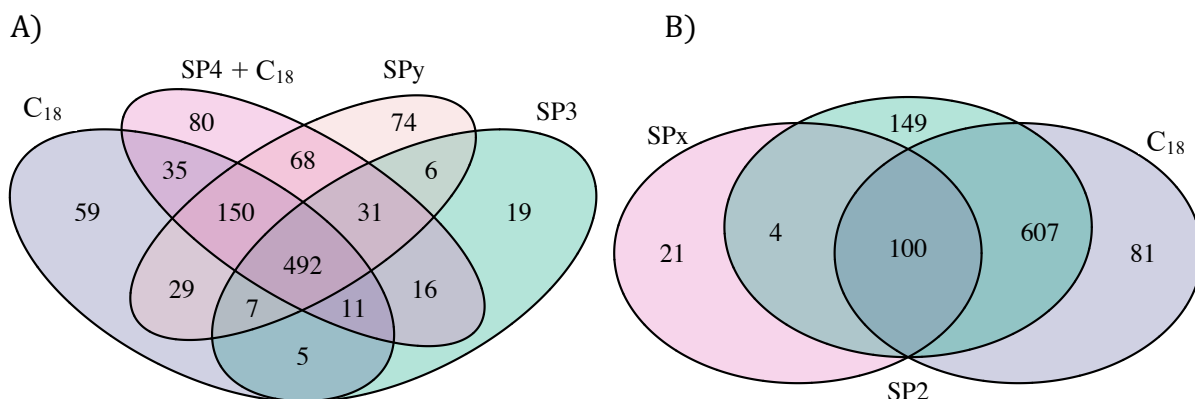


F4. ábra: A különböző peptid tisztítási módszerekkel előkészített prosztata szövetmetszetminták kromatogramja. C₁₈: standard protokoll; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer, SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer.

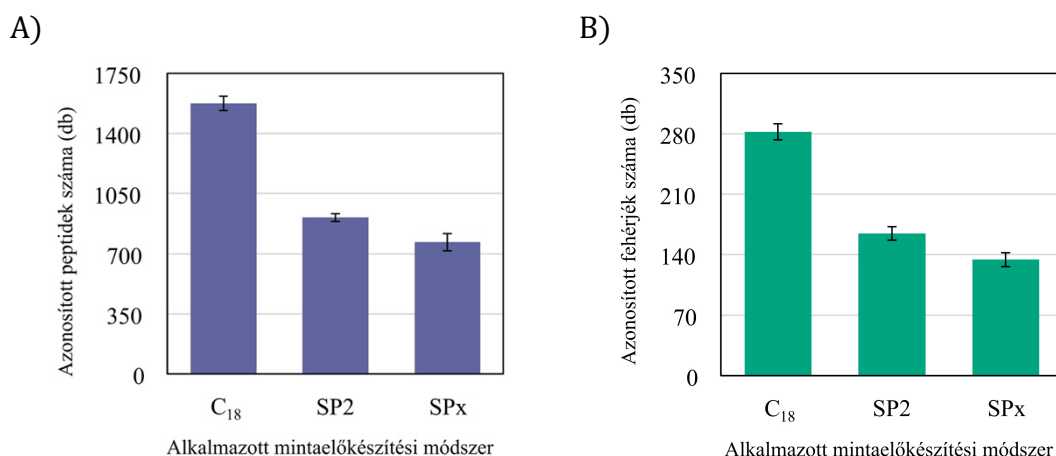
9.2. Összehasonlítás az azonosított peptidek és fehérjék száma alapján



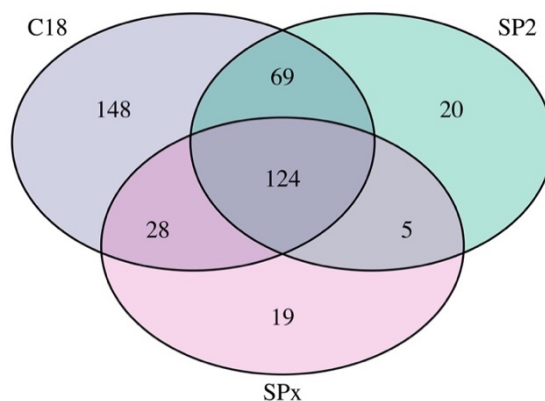
F5. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített tüdő sejtmembránmintákból azonosított peptidek (A) és fehérjék (B) száma. C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer. n = 3



F6. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített tüdő sejtmembránmintákból azonosított fehérjék megoszlása. A) A fehérje tisztítási módszerekkel előkészített minták. B) A peptid tisztítási módszerekkel előkészített minták. C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer.

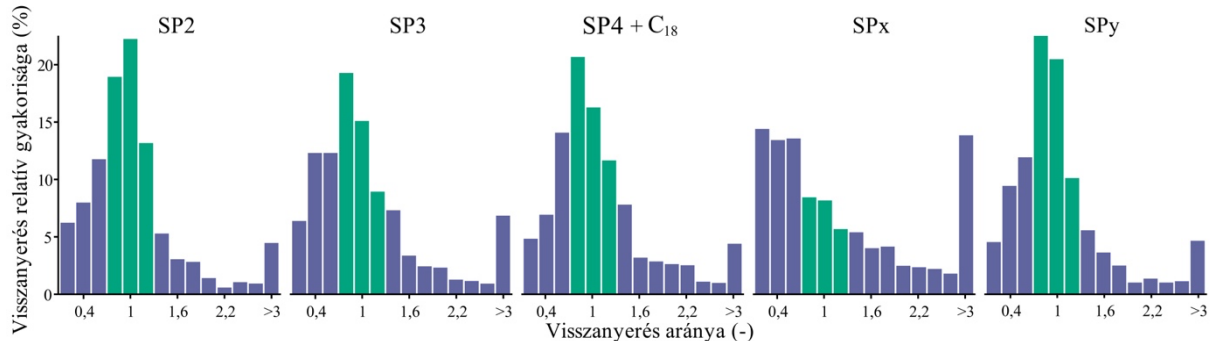


F7. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített prosztata szövetmetszetmintákból azonosított peptidok (A) és fehérjék (B) száma. C₁₈: standard protokoll; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer. n = 3

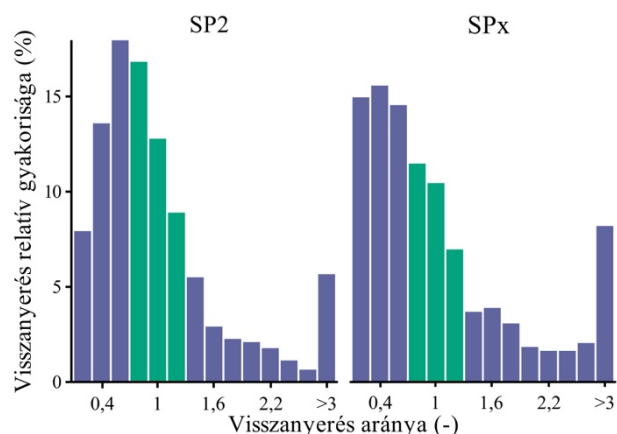


F8. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített prosztata FFPE szövetmetszetmintákból azonosított fehérjék megoszlása. A peptid tisztítási módszerekkel előkészített minták. C₁₈: standard protokoll; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer.

9.3. Összehasonlítás a relatív visszanyerések alapján

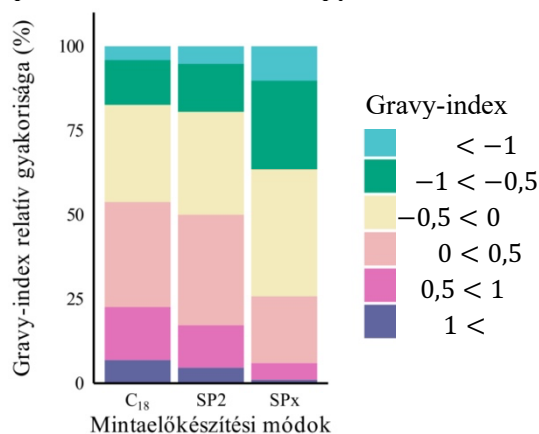


F9. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített tüdő sejtmembránminták relatív visszanyerés hisztogramja. C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer. Zöld színnel az ideális visszanyerési arány (0,8-1,2) van jelölve.

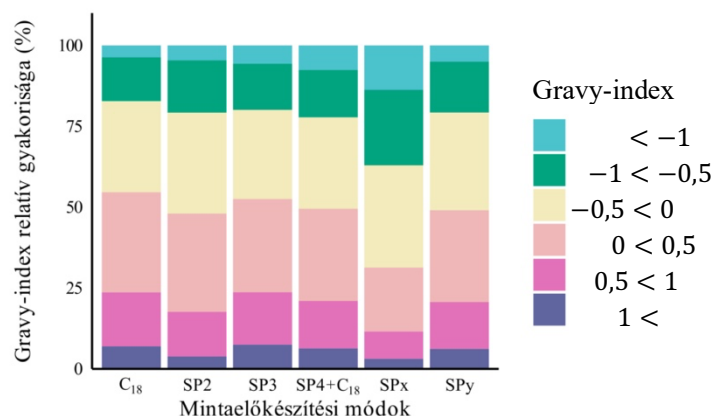


F10. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített prosztata szövetmetszet minták relatív visszanyerés hisztogramja. C₁₈: standard protokoll; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer. Zöld színnel az ideális visszanyerési arány (0,8-1,2) van jelölve.

9.4. Összehasonlítás a peptidek hidrofilitása alapján

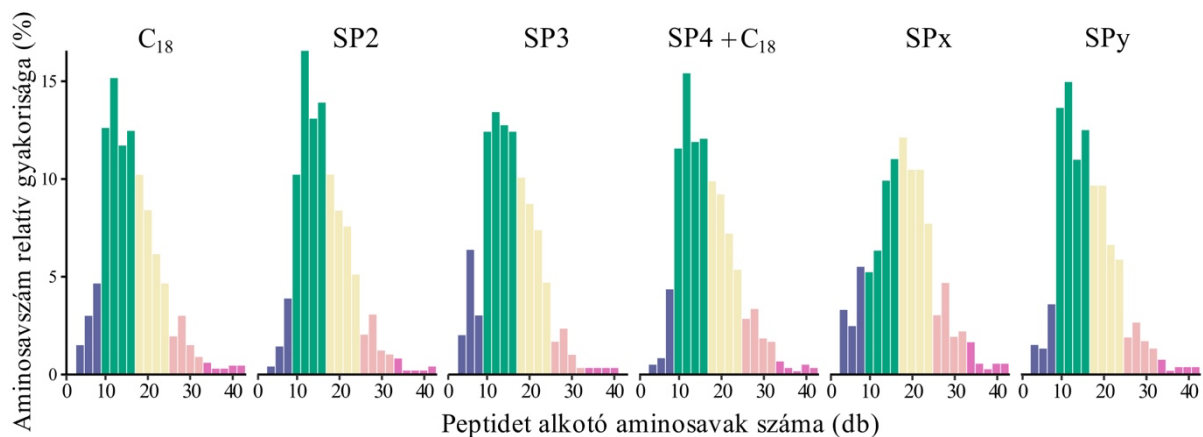


F11. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített prosztata szövetmetszetmintákból azonosított peptidek Gravy-index szerinti eloszlás ábrája. Hidrofil: negatív Gravy-index, Hidrofób: pozitív Gravy-index C₁₈: standard protokoll; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer, SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer.

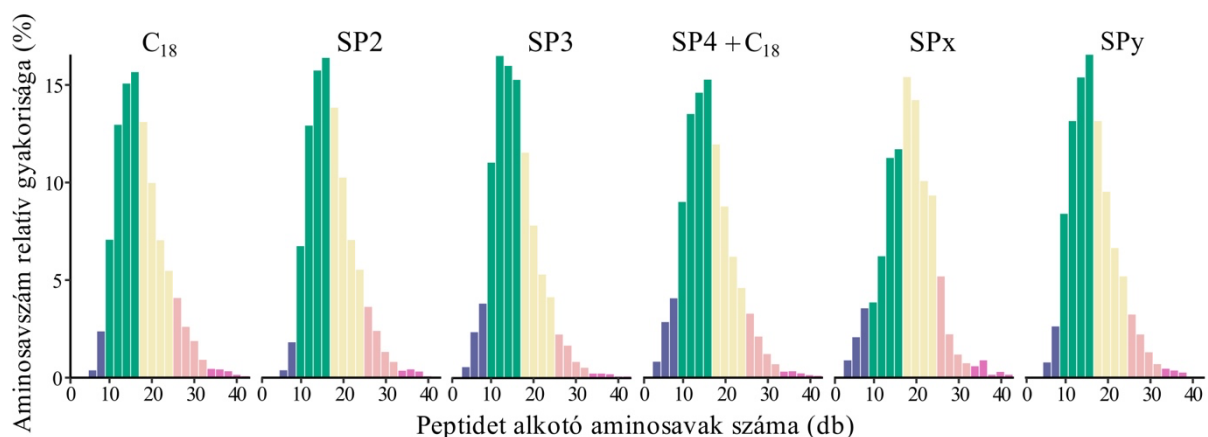


F12. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített tüdő sejtmembránmintákból azonosított peptidek Gravy-index szerinti eloszlás ábrája. Hidrofil: negatív Gravy-index, Hidrofób: pozitív Gravy-index C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer.

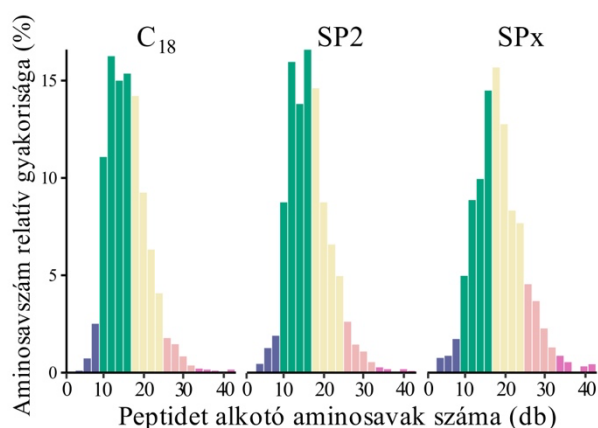
9.5. Összehasonlítás az azonosított peptidek hossza alapján



F13. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített vérplazmamintákból azonosított peptidek relatív méreteloszlása. C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer. A színek csak a szemléltetést segítik.



F14. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített tüdő sejtmembránmintákból azonosított peptidek relatív méreteloszlása. C₁₈: standard protokoll; SP3: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló fehérje tisztítási módszer; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SP4+C₁₈: irodalmi oldószeres kicsapáson alapuló mintaelőkészítési módszer C₁₈ tisztítással; SPy: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer. A színek csak a szemléltetést segítik.



F15. ábra: A különböző mintaelőkészítési módszerekkel előkészített prosztata szövetmetszetmintákból azonosított peptidek relatív méreteloszlása. C₁₈: standard protokoll; SP2: irodalmi paramágneses gyöngyök használatán alapuló peptid tisztítási módszer; SPx: saját fejlesztésű paramágneses gyöngyökön alapuló peptid tisztítási módszer. A színek csak a szemléltetést segítik.