

Karvaly Krisztián Márk

**Szilárdfázisú extrakciós (SPE) tisztítási módszerek
optimalizálása kis mennyiségű komplex biológiai minták
proteomikai és foszfoproteomikai alkalmazására**

Témavezetők

Dr. Turiák Lilla
tudományos főmunkatárs,
kutatócsoport-vezető

Bugyi Fanni
tudományos segédmunkatárs



HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont,
MTA-TTK Lendület Glikán Biomarker Kutatócsoport



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar Kémiai
Intézet Analitikai Kémiai Tanszék

Budapest, 2025

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőimnek, Dr. Turiák Lillának és Bugyi Fanninak, hogy bevezettek a proteomika világába. Köszönöm iránymutatásaikat, tanácsaikat, áldozatos munkájukat, melyek nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Szeretnék köszönetet mondani az MTA Lendület Glikán Biomarker Kutatócsoport minden további tagjának, akik szakmai támogatásukkal és értékes tanácsaikkal gazdagították a munkámat.

Köszönöm az Országos Onkológiai Intézet munkatársainak a prosztataametszetek proteomika frakciójának folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrometriás mérését.

Köszönöm Klosterneuburg-i Institute of Science and Technology Austria munkatársainak a prosztataametszetek foszforproteomika frakciójának folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrometriás mérését.

TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
Rövidítésjegyzék	5
1. Bevezetés, célkitűzés	6
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. Poszttranszlációs módosítások	7
2.2. Proteomika	8
2.2.1. Tömegspektrometria alapú proteomika	9
2.2.2. Tömegspektrometria alapú proteomikai munkafolyamat	12
2.2.3. Kvantitatív proteomika	14
2.3. Szilárdfázisú extrakció (SPE)	15
2.3.1. SPE lépései	15
2.3.2. Peptidek SPE tisztításának hatékonyságát befolyásoló tényezők	16
2.3.3. Peptidek SPE tisztítási lehetőségei	18
2.4. Foszfoproteomika	18
2.4.1. Foszfoproteomika kihívásai	19
2.4.2. Foszfopeptid dúsítási lehetőségek	19
2.4.3. Foszfopeptidek tisztítási lehetőségei	22
2.5. Proteomika és foszfoproteomika szerepe a prosztaták kutatásában	23
2.5.1. Proteomika	23
2.5.2. Foszfoproteomika	24
3. Anyagok és Módszerek	25
3.1. Felhasznált anyagok	25
3.1.1. Felhasznált minták	25
3.2. Módszerfejlesztés peptidek SPE tisztítására	26
3.2.1. nanoHPLC-MS/MS mérés	29
3.2.2. Adatelemzés	29

3.3. Módszerfejlesztés foszfopeptidek SPE tisztítására.	30
3.3.1. FFPE metszetek előkészítése.	30
3.3.2. Foszfopeptidek tisztítása.	31
3.3.3. nanoHPLC-MS/MS mérés.	31
3.3.4. Adatelemzés.	33
3.4. Prosztatametszetek vizsgálata.	33
3.4.1. FFPE metszetek előkészítése.	33
3.4.2. Foszfoproteomikai nanoHPLC-MS/MS mérés.	33
3.4.3. Foszfoproteomikai adatelemzés.	34
3.4.4. Proteomikai nanoHPLC-MS/MS mérés.	34
3.4.5. Proteomikai adatelemzése.	35
4. Eredmények.	36
4.1. SPE módszer fejlesztése peptidek tisztítására.	36
4.1.1. Azonosított fehérjék és peptidek száma.	36
4.1.2. A módszerek szelektivitása.	38
4.2. Foszfopeptid-tisztító SPE módszer fejlesztése.	40
4.2.1. Azonosított foszfopeptidek száma.	40
4.2.2. A módszerek szelektivitása.	42
4.3. Prosztata szövetmetszetek vizsgálata.	45
4.3.1. Prosztata metszetek (foszfo)proteomikai vizsgálatának eredményei.	45
5. Összefoglalás.	49
Irodalomjegyzék.	50

Rövidítésjegyzék

AA — ecetsav

ACN — acetonitril

CID — ütközés indukált disszociáció

CA — citromsav

DDA — adatfüggő mérési mód

DIA — adatfüggetlen mérési mód

ECD — elektron befogásos disszociáció

ESI — elektropray ionizáció

ETD — elektron transzfer disszociáció

EtOH — etanol

FA — hangyasav

FFPE — formalin-fixált paraffinba
ágyazott

Foszfopeptid — foszforilált peptid

FT-ICR — Fourier-transzfomációs
ionciklotron rezonancia

HeLa — HeLa fehérje emésztmény
standard

HFBA — heptafluor-butánsav

HPLC — nagy teljesítményű
folyadékkromatográfia

IAA — jód-acetamid

IP — izoelektromos pont

m/z — tömeg/töltés

MALDI — mátrix segített lézer
deszorpció, ionizáció

MeOH — metanol

MOAC — fém-oxid affinitás
kromatográfia

MS — tömegspektrométer

MS/MS — tandem tömegspektrométer

nanoHPLC-MS/MS — nanoáramlásos
nagyhatékonyságú folyadék-
kromatográffal kapcsolt tandem
tömegspektrométer

OT — Orbitrap

PTM — poszttranszlációs módosítás

Q — kvadrupol

RapiGest — RapiGest™ SF

SPE — szilárdfázisú extrakció

TFA — trifluor-ecetsav

TOF — repülési idő analizátor

1. Bevezetés, célkitűzés

A fehérjék az élő szervezetben nagy mennyiségben előforduló, változatos funkciót betöltő alkotóelemek, például vázanyagok, enzimek. A fehérjék vizsgálata az élő szervezet működésének megértése szempontjából elengedhetetlen. A fehérjék, hogy betöltsék funkciójukat, a transzlációt követően úgynevezett poszttranszlációs módosításokon (PTM-eken) mennek keresztül, melyek során egy-egy nem fehérje jellegű molekulacsoport épül be, vagy válik ki a fehérje oldalláncairól. Ezen módosítások révén játszódnak le a szervezetben a különböző biológiai folyamatok, pl. a sejtciklus szabályozása, a fehérjék kölcsönhatásinak kialakítása, vagy a jelátviteli folyamatok. Az expresszáladott fehérjék, valamint a PTM-ek minősége és mennyisége a szervezetben dinamikusan változik, amely kapcsolatba hozható betegségek kialakulásával és előrehaladásával. A PTM-ek egyik fajtája a foszforiláció, amely során a fehérje oldalláncára egy foszfátcsoport épül be, valamint az ezzel ellentétes irányú folyamat a defoszforiláció. A foszforilációnak számos egyéb biológiai funkció mellett a rákos megbetegedésekben is fontos szerepe van, többek között a prosztatatarákos megbetegedésekben is.^[1, 2] A prosztatatarák fejlődését például gyakran a kinázok szabálytalan foszforilációja okozza.^[3]

Napjainkban a komplex biológiai minták proteomikai vizsgálatára széles körben alkalmazott technika a nanoáramlásos nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrometria (nanoHPLC–MS/MS). Az érzékeny és nagy áteresztőképességű analízishez a mérést megelőzően szükséges egy hatékony tisztítómódszert alkalmazni, hogy a mintaelőkészítés során alkalmazott reagensektől, pufferektől megszabaduljunk. Erre a célra széles körben használt módszer a szilárdfázisú extrakció (SPE). A publikált módszerek jelentős része azonban nem körültekintően optimált, ezért szükséges további optimálást végezni a lehető leghatékonyabb tisztítás elérése érdekében.^[4]

Az általunk végzett kutatás során kis mennyiségű (0,5-1 µg) komplex biológiai minták vizsgálatához optimáltunk proteomikai és foszfoproteomikai SPE tisztítómódszereket. Az így kidolgozott eljárásokat klinikailag értékes prosztataszövet metszetek vizsgálatához használtuk fel.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Poszttranszlációs módosítások

A PTM-ek nagymértékben befolyásolják a fehérjék tulajdonságait, általuk nyerik el funkciójukat, aktiválódnak, deaktiválódnak, meghatározzák azok szerkezetét, kölcsönhatásait más molekulákkal, azaz alapvetően határozzák meg a fehérjék szervezetben betöltött szerepét. Már több mint 400 különböző típusú PTM^[5] ismert, melyek számos funkcióval láthatják el a szervezetben található fehérjéket. A leggyakrabban előforduló PTM-et, valamint azok biológiai szerepét az 1. táblázat tartalmazza.^[2]

Adott fehérjéken a PTM-ek megjelenésének vagy mennyiségük változásának hatására átalakulhat, vagy elveszhet a fehérjék eredeti funkciója. Mindez kapcsolatba hozható betegségek jelenlétével, előrehaladásával. Többek között ilyen összefüggést találtak a Tau fehérjék hiperfoszforilációja és az Alzheimer-kór jelenléte között.^[2]

1. táblázat Példák poszttranszlációs módosításokra és azok szerepére az élő szervezetben^[2, 6-8]

PTM			Példa funkciókra
neve	reverzibilis vagy irreverzibilis	előfordulás (leggyakoribb)	
Acetiláció	létezik reverzibilis és irreverzibilis is	fehérje N-terminálisa, Lys	– fehérje stabilitás, – DNS hibák javítása, – transzkripció szabályozása
Metiláció	reverzibilis	Lys, Arg, His, Asn, Gln	– szövetek öregedésének szabályozása, – transzkripció szabályozása
Glikoziláció	reverzibilis	N-glikolizáció: Asn O-glikolizáció: Ser, Thr, Tyr C-mannolizáció: Trp	– sejt–sejt kölcsönhatás, – fehérjelebontás, – fehérjefeltekeredés, – fehérje oldhatóságára hatással van, – jelátvitel
Ubiquitináció	reverzibilis	Lys, Ser, Thr, Cys	– sejtaktivitás, – transzkripció szabályozása, – jelátvitel szabályozása, – DNS hibák javítása

1. táblázat Folytatás

PTM			Példa funkciókra
neve	reverzibilis vagy irreverzibilis	előfordulás (leggyakoribb)	
Oxidáció	létezik reverzibilis és irreverzibilis is	Met, Trp, Pro, Cys, Arg, Lys, His	– öregedés, – fehérje szerkezetének reverzibilis módosítása
Foszforiláció	reverzibilis	Ser, Thr, Tyr	– fehérjeaktivitás, – fehérje-fehérje kölcsönhatás, – jelátvitel

2.2. Proteomika

A *proteom* definíció szerint a genom által kódolt teljes fehérjekészlet^[9, 10], a *proteomika* pedig ennek vizsgálatával foglalkozik^[10, 11]. A *proteoforma* egy adott fehérje különböző variációit jelenti.^[12] Mivel egyszerre nem expresszálódik a genom által kódolt összes fehérje^[13], továbbá számos tényező (pl. egyed környezete, egyed életkora, egyed kórélettani állapota mintavételkor) befolyásolja, hogy milyen fehérjék jelennek meg az adott szervezetben, így egy-egy vizsgálat során a mintában az adott pillanatban expresszálódott fehérjéket lehetséges elemezni.^[2, 14, 15] A proteomikai vizsgálatoknak számos célja lehet, pl. fehérje-fehérje kölcsönhatások, egy fehérje funkcióinak, lokalizációjának meghatározása, vagy egy komplex biológiai minta fehérjeinek azonosítása és mennyiségük meghatározása.^[14]

Eleinte a fehérjék vizsgálatához kémiai reakciók útján történő szekvenálást használtak, az egyik ilyen sokat használt eljárás az Edman szekvenálás volt. A módszer limitációi, valamint a tömegspektrometria fejlődése miatt manapság a proteomikai vizsgálatokhoz széles körben tömegspektrométert használnak.^[14]

Hagyományos vizsgálat. A tradicionális tömegspektrometria (MS) alapú eljárással hosszú éveken keresztül végeztek proteomikai vizsgálatokat. Az eljárás során a fehérjéket kétdimenziós gélelektroforézissel elválasztották egymástól, majd az egyes fehérjefoltokat kivágták a gélből és enzimatis emésztésnek vetették alá. Az így kapott peptidkeveréken tandem tömegspektrometriás (MS/MS) vizsgálatot végeztek, majd adatbáziskeresés segítségével azonosították a fehérjéket.^[16]

A kétdimenziós gélelektroforézishez pl. poliakrilamid gélét használtak. Az első dimenziós elválasztás során a mintát egy olyan gélen futtatták meg, melyben pH gradiens van, a fehérjék elérve az izoelektromos pontjuknak megfelelő pH-t az elektromos térben nem mozdultak tovább. Majd az elsőre merőleges irányban újabb futtatást végeztek nátrium-dodecil-szulfát

tartalmú gélen. Amennyiben denaturált (redukált, alkilált) fehérjén végezték az elválasztást, akkor tömeg szerinti elválást érhettek el.^[12]

Ennek a gélalapú eljárásnak igen fontos korlátai vannak, pl. komplex minta esetében a fehérjék nem válnak el egymástól megfelelő mértékben, alacsony reprodukálhatóság, időigényesség, így mára ez az eljárás háttérbe szorult.^[12]

Modern vizsgálat. Napjainkban számos vizsgálati technika, különböző készülékek, ionizációs technikák, képalkotó eljárások állnak a szakemberek rendelkezésére. A mi kutatásunk során „shotgun” proteomikai vizsgálatot végeztünk, azaz komplex minta fehérjéit olyan módon azonosítottuk, hogy a minta fehérjéit oldatban elemésztettük, és a keletkezett peptidek alapján határoztuk meg a mintában található fehérjéket. Az ilyen fajta vizsgálatokban a minta komplexitásának csökkentésére gyakran alkalmaznak nanoUHPLC-t, ennek a legfőbb különbsége a hagyományos nagy teljesítményű folyadékkromatográfokkal (HPLC) szemben, hogy nL/perc áramlási sebességgel áramoltatják az eluenst. A kisebb áramlási sebességnek köszönhetően jóval nagyobb ionizációs hatásfok érhető el a tömegspektrométerben. A hatékonyabb elválasztás érdekében a kolonnatöltet szemcséinek átmérője kb. 1,5-3 μm , ez azonban jelentős nyomásesést okoz, ezért szükséges a hagyományos HPLC-nél nagyobb nyomáson működő UHPLC.^[12, 17]

Az LC-vel való kapcsolás nem egyedül azért előnyös, mert hatékony elválasztás érhető el vele, hanem mivel online kapcsolható a tömegspektrométerrel, így automata injektort használva egyszerűbb a mintabevitel és a bevitt mintamennyisége is jobban reprodukálható.

Proteomika kihívásai. A proteomika tudománya bár rendkívül dinamikusan fejlődik, napjainkban is számos kihívással néznek szembe a kutatók. Az egyik ilyen, hogy egy mintában a fehérjék koncentrációja széles tartományban változhat, így a nagy mennyiségben jelenlévő fehérjék elnyomják a kis mennyiségben jelenlévők jelét az MS mérés során. További nehézség, hogy bizonyos fehérjék oldatba vitele nehéz. A PTM-ek kis mennyiségű jelenléte, egyes esetekben labilis mivolta, nehezebb ionizálhatósága miatt szintén nagy kihívást okoz ezek vizsgálata.^[12, 18]

2.2.1. Tömegspektrometria alapú proteomika

A tömegspektrométerek három fő egységből állnak: ionforrás, analizátor és detektor. Az ionforrás gáz halmazállapotú ionokat képez a mintából, majd az analizátor tömeg/töltés (m/z) szerint elválasztja őket és a detektor az ionok mennyiségével arányos jelet képez.^[19]

Ionforrás. A fehérjék és peptidek vizsgálatára a lágy ionizációs technikák alkalmasak, mely során nem, vagy csak csekély mértékű fragmentáció következik be. Ilyen ionizációs

technikák például az elektropray ionizáció (ESI) vagy a mátrix segített lézer deszorpció, ionizáció (MALDI). Az ESI ionizáció során a minta egy vékony fém kapillárison keresztül jut a készülékbe, melyre nagyfeszültséget kapcsolnak, elősegítve a porlasztást és az ionok képződését. A cseppek képződésének és a bennük lévő oldószer elpárologtatásának elősegítésére meleg porlasztógázt (pl. N_2) is alkalmaznak. Ezen ionizációs módszer alkalmazásakor jellemzően többszörös töltésű ionok képződnek. Az ESI légköri nyomáson működik, így HPLC-vel kapcsolható, ami rendkívül megkönnyíti a mintabevitelt.^[19]

A MALDI ionforráshoz a mintát összekeverik nagy mennyiségű olyan mátrixszal, mely az alkalmazott lézer hullámhosszán nagy mértékben abszorbeál fényt. A kikristályosított mintamátrix elegyet lézerfényvel besugározva a mátrix felmelegszik és ionizálódik, közben deszorbeálódik a mintával együtt, majd gázfázisban a mátrix átadja töltését a minta fehérjének, peptidjeinek. A MALDI ionizáció során létrejövő ionok főként egyszeres töltéssel rendelkeznek.^[12, 19]

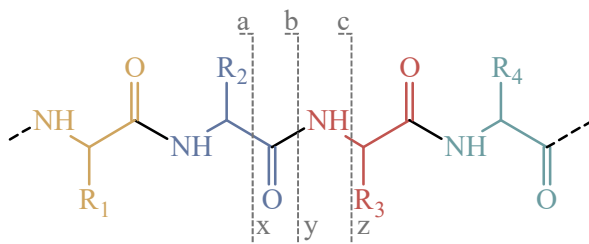
Analizátor. A proteomikában négyféle analizátor terjedt el: kvadrupol (Q), repülési idő (TOF), Orbitrap (OT), Fourier-transzformációs ionciklotron rezonancia (FT-ICR). A Q analizátor négy párhuzamosan elhelyezett fémrúdból áll, amelyekre rádiófrekvenciát és egyenáramot kapcsolnak, ezen terek változtatása alkalmas meghatározott m/z értékű ionok kiválasztására. A TOF analizátor alkalmazása során nagy, azonos kinetikus energiára gyorsítják az ionokat, majd ezek kellő hosszúságú utat megtéve m/z alapján szeparálódnak, mivel a repülési idejük az m/z értékükkel arányos. Az FT-ICR analizátorban szupravezető mágneses tér és elektrosztatikus tér segítségével körpályára kényszerítik az ionokat, majd az így indukált feszültség alapján Fourier-transzformációval nyerik ki a tömegspektrumhoz szükséges információt. Az OT úgy működik, mint FT-ICR csak nem szupravezető mágnessel, hanem rádiófrekvenciás és egyenáramú tér segítségével kényszerítik körmozgásra az ionokat.^[12, 19]

Tandem tömegspektrometria. MS/MS méréssel a peptidok szerkezetéről részletesebb szerkezeti információ nyerhető. Ennek alapja, hogy az ionizáció során képződött prekursor ionokat m/z alapján elválasztják, majd a kiválasztott prekursor ionok belső energiáját megnövelve az ütközési cellában fragmentálódnak és az így keletkezett fragmens ionokat m/z alapján elválasztják és detektálják.

A prekursor ionok fragmentálását például végezhetik ütközés indukált disszociáció (CID), elektron befogásos disszociáció (ECD), elektron transzfer disszociáció (ETD) révén. A CID gerjesztésnél az ionokat elektromos erőterben gyorsítják, majd valamilyen inert gázzal (pl. He, Ar, N_2) ütköztetik, így kinetikus energiájuk egy része belső energia növelésre fordítódik,

aminek hatására az ionok fragmentálódnak. Az ETD gerjesztésnél anionnal, az ECD gerjesztésnél elektronnyalábbal ütköztetik az ionokat.^[12, 20]

Az egyes gerjesztések által szabályszerűen történik a fehérjék/peptidek fragmentációja. A kutatás során általunk is használt CID gerjesztés során főleg b-, y-ionok (1. ábra), immónium-ionok és belső ionok keletkeznek. Az ECD és az ETD gerjesztésnél c-, z-ionok (1. ábra) képződnek. Utóbbi gerjesztési módszerek PTM vizsgálatánál előnyösek, ugyanis a fragmentáció során a PTM-ek nem hasadnak le.^[12, 20]



1. ábra Peptidek fragmentációs mintázata

MS/MS mérési módszerek. A „shotgun” proteomikában kétféle MS/MS mérési módot használnak, az adatfüggőt (DDA) és az adatfüggetlent (DIA). A DDA mérési módban a kromatográfiás oszlopról eluálódó mintarészletről (tipikusan 50-200 ms) a műszer felvesz egy MS spektrumot, majd adott ideig a legintenzívebb ionokról MS/MS spektrumot vesz fel vagy pedig előre megadott számú legintenzívebb ionról készít MS/MS spektrumot. A DIA mérési mód során a teljes tömegspektrum vizsgálatra kerül úgy, hogy az első tömegspektrumot a műszer meghatározott számú m/z tartományra osztja fel, majd ezeken a tartományokon belüli peptidionokat fragmentálja és veszi fel róluk az MS/MS spektrumokat.^[12]

A DDA mérési módban a kis intenzitásban előforduló peptidekről nem történik MS/MS felvétel, valamint a módszer reprodukálhatósága is kisebb, mint a DIA mérési módban. A DIA mérési mód előnye, hogy nem vesz el információ az MS/MS spektrumból, és így bármikor visszakereshető. Ugyanakkor egy MS/MS spektrum több prekursor ion fragmenseit tartalmazza, így komplexebb, ezért nehezebb azok kiértékelése. Továbbá így információgazdagabb egy-egy MS/MS spektrum, ezért több tárhelyet foglal. A DIA mérések értékeléséhez sok esetben spektrumkönyvtárakra támaszkodnak, mely akár készülhet ugyanazon mintatípus DDA méréseiből is. Kutatásunk során a módszerfejlesztésekhez, a prosztatametszetek foszfoproteomikai frakciójának vizsgálatára DDA mérési módot, a prosztatametszetek proteomikai frakciójának vizsgálatához DIA mérési módot használtunk.^[12]

Peptidek azonosítása. Manapság „shotgun” proteomikában leggyakrabban úgy végzik a peptidek azonosítását, hogy online adatbázist használnak, mely adott fajban azonosított

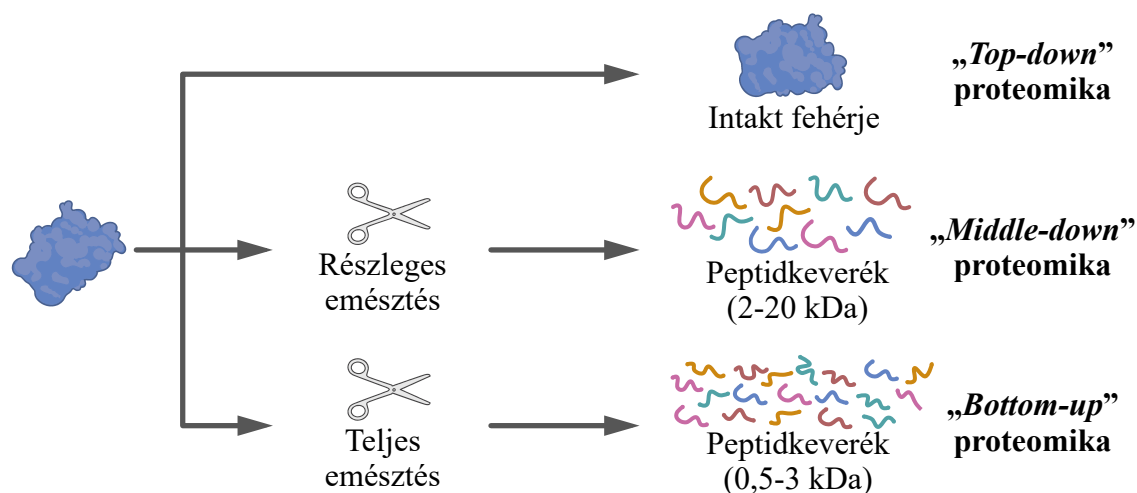
fehérjék szekvenciáját tartalmazza. Ezekon a fehérjéken „*in silico*” (számítógép által szimulált) emésztést végeznek, a megadott enzimmal, ezt követően a szoftver a beállított tömegspektrométer paramétereinek megfelelően generál MS/MS spektrumokat. Az így kapott spektrumokat összehasonlítja a mért spektrumokkal. Az összehasonlításakor az egyezések mértékét a szoftver pontszámmal jellemzi és a legjobb pontszámot elérő peptid-spektrum egyezést tekinti azonosítottnak. Hátránya, hogy olyan fehérjéket, amik nincsenek benne az adatbázisban, nem tudnak azonosítani. Továbbá a nagy keresési tér miatt csökken a helyes találatok valószínűsége. Utóbbi hatását egyrészt úgy tudják csökkenteni, hogy egyszer lefuttatják a keresést a mért spektrumokon egy nagyobb adatbázist használva, majd utána az azonosított peptidekhez tartozó fehérjéken ismét lefuttatják a keresést. Továbbá a keresésénél paraméterek (pl. kihagyott hasítási helyek száma, PTM-ek száma) számának csökkentésével is lehet a keresési tér méretét csökkenteni.^[12]

Emellett létezik még a „*de novo*” szekvenálás, amikor adatbázis nélkül az MS és MS/MS tömegspektrumok alapján szoftver vagy manuális értékelés segítségével azonosítják a peptideket. Ennek hátránya, hogy nagy felbontású spektrumokat igényel.^[12]

Fehérje azonosítása. A „*shotgun*” proteomikai vizsgálatok során általánosan bevett szokás, hogy egy fehérjét akkor tekintenek azonosítottnak, ha legalább két olyan egyedi peptidje megbízhatóan azonosított, melyek a használt adatbázison belül csak az adott fehérje adott enzimatis emésztésével állítható elő.

2.2.2. Tömegspektrometria alapú proteomikai munkafolyamat

Egy proteomikai vizsgálatnak számos célja lehet, pl. egy-egy intakt fehérje karakterizálása, PTM-ek, szerkezet meghatározása, vagy komplex biológiai minta (pl. testfolyadék, szövet, sejt) minél részletesebb feltérképezése. Attól függően, hogy mi a célja a vizsgálatnak, más-más mintaelőkészítés, műszerezettség, méréstípus szükséges.^[21] A fehérjéket a tömegspektrometria alapú proteomika keretében három megközelítés szerint vizsgálhatják, ezeket az 2. ábra szemlélteti.



2. ábra Különböző proteomika megközelítések fehérjék vizsgálatára. Az ábra BioRender használatával készült

„Top-down” megközelítés. Ennek során a mintában lévő intakt fehérjéket juttatják be a tömegspektrométerbe. A módszer egyetlen fehérje, vagy kis komplexitású fehérjekeverék vizsgálatára használható. Utóbbi esetben elválasztástechnikai módszerekkel csökkentik a minta komplexitását, erre alkalmasak a különböző folyadékkromatográfiás technikák (pl. fordított fázisú, hidrofób kölcsönhatáson alapuló, ioncsere kromatográfia), gélelektroforézis és kapilláris elektroforézis. Mivel az intakt fehérjét vizsgálják, ezért közel 100%-os a szekvenciafedettség, így a fehérje proteoformáinak és PTM-jeinek azonosítása teljesen megbízható, emellett olyan információ is nyerhető a fehérjéről, amely más megközelítési módszereknél elveszne (pl. PTM-ek kölcsönhatása). A méréshez nagy felbontású MS szükséges, ilyen a TOF MS, FT-ICR MS, Orbitrap MS. [21-23]

A módszer hátránya, hogy a szükséges bonyolult műszerezettség nagy szakértelmet igényel, a fehérje vizsgálati tömegtartománya limitált, továbbá komplex biológiai minták nem vizsgálhatóak ilyen módon. [21-23]

„Bottom-up” megközelítés. Ilyen vizsgálat során a mintában lévő fehérjéket peptidekké emésztik, majd az így keletkezett kb. 7-20 aminosavból álló peptideken végeznek MS/MS mérést. Az emésztés eredményeként nagyszámú peptid képződik, ezért az MS mérést megelőzően elválasztástechnikai módszerrel csökkentik a minta komplexitását, erre alkalmas az MS-sel kapcsolható kapilláris elektroforézis, vagy HPLC. A peptideken végzett folyadékkromatográfiás elválasztás hatékonyabb, mint a fehérjéken végzett. Az MS méréshez leggyakrabban alkalmazott elrendezések az ESI-OT MS, az ESI-QTOF MS. A módszer nagyon érzékeny, mivel a keletkező peptidek kisebb tömegűek és kevesebb töltésállapotot vehetnek fel, mint a kiindulási fehérjék. A módszer egy fehérje (célfehérje), valamint komplex biológiai minta vizsgálatára is alkalmas. Hátránya, hogy az emésztés során keletkező több ezer peptidből

a minta komplexitása miatt nem mind kerül azonosításra. A nem megfelelő szekvenciafedettség esetén nem lehetséges a fehérje összes PTM-je és proteoformáinak azonosítása.^[21-23]

A „*shotgun*” proteomika a „*bottom-up*” proteomikának egy speciális fajtája, amikor komplex biológiai mintát vizsgálunk „*bottom-up*” megközelítéssel.^[19] A kutatásunk során mi is ezt a vizsgálati módszert használtuk.

„**Middle-down**” megközelítés. Kivitelezése olyan, mint a „*bottom-up*” annyi különbséggel, hogy ez esetben nem teljes, hanem csak részleges emésztést végeznek és az így keletkezett hosszabb (20-100 aminosavból álló) peptideken végeznek MS/MS vizsgálatot. A módszert egyfajta köztes megoldásként találták ki, hogy a „*top-down*” és a „*bottom-up*” módszer előnyeit egyesítsék, hátrányait kiküszöböljék.^[21, 22]

2.2.3. Kvantitatív proteomika

Legtöbbször a fehérjék minőségi meghatározása mellett azok mennyiségi meghatározása is fontos, amely révén akár azonosítani lehet potenciális marker molekulákat, jobban megérthetők a biológiai folyamatok, illetve összehasonlítható különböző kezelések hatása. A kutatás céljától függően a különböző mintákban lévő fehérjék relatív és abszolút koncentrációját is meghatározhatják.^[12, 24]

A különböző minták fehérjeinek kvantifikálására stabil izotóppal történő jelöléses és jelölésmentes technikákat fejlesztettek ki. A stabil izotópos jelölés lényege, hogy a különböző mintákat valamilyen módon izotópjelöléssel látják el. Ez például történhet úgy, hogy sejtkultúra esetében olyan tápanyagot használnak, mely izotópdúsított, vagy a mintaelőkészítés során emésztés előtt vagy után a fehérjére/peptidre jelölőcsoportot kötnek. A jelölést követően a mintákat összekeverik, majd a mintaelőkészítést és a HPLC-MS/MS mérést az így kapott keveréken végzik. Emellett végezhetik a kvantifikálást jelölésmentes módszerekkel, melynek lényege, hogy a teljes mintaelőkészítést az összes mintán külön-külön elvégzik, majd az előkészített mintákon egymás után végzik el a HPLC-MS/MS mérést.^[12, 24]

A jelölésmentes módszer előnye, hogy egyszerűbb a mintaelőkészítés, olcsó, és korlátlan számú minta vizsgálható ilyen módon. Ugyanakkor a mérések varianciája nagyobb, mint a jelöléses módszerek esetében, a mintákon külön-külön végzett mintaelőkészítés miatt. További hátránya a jelölésmentes módszernek, hogy nagyon stabil HPLC-MS/MS rendszert igényel, továbbá abszolút mennyiségi meghatározásra nem alkalmas.^[12, 24, 25]

A kutatás során általunk is használt jelölésmentes módszernél a minták közötti relatív fehérje koncentráció meghatározása történhet a prekursor peptidion kromatográfiás csúcs alatti

területének összehasonlításával vagy a peptidekről felvett MS/MS spektrumok száma alapján.^[12, 24, 25]

2.3. Szilárdfázisú extrakció (SPE)

A szilárdfázisú extrakció (SPE) egy elválasztástechnikai művelet. Alapja, hogy egy minta különböző komponensei vagy megoszlanak egy állófázis és egy oldat között, vagy az oldatból különböző erősséggel adszorbeálódnak az állófázisra. A módszert a proteomika mellett számos területen, pl. környezet-, vagy gyógyszeranalitikában, ipari vizsgálatokban, gyógyászati, biológiai vizsgálatoknál használják, ugyanis egyszerű, gyors és kevés szerves oldószert igényel. Célja többek között pl. a minta szennyezőktől való megtisztítása, extrahálás, frakcionálás, dúsítás.^[26-28]

Az MS alapú „shotgun” proteomikában a HPLC-MS/MS mérést megelőzően mindenképpen szükséges egy megfelelő tisztító eljárás alkalmazása annak érdekében, hogy eltávolítsuk a szennyezőket, amelyek akár a biológiai mintából, akár a mintaelőkészítésnél alkalmazott reagensekből származhatnak. A szennyezők akadályozhatják a mérést, vagy rosszabb esetben károsíthatják a műszert. Megfelelő tisztító eljárás alkalmazásával növelhető a mérések reprodukálhatósága, az azonosított peptidek száma, valamint csökkenthető a műszer karbantartására fordított idő és költség.^[4, 29, 30]

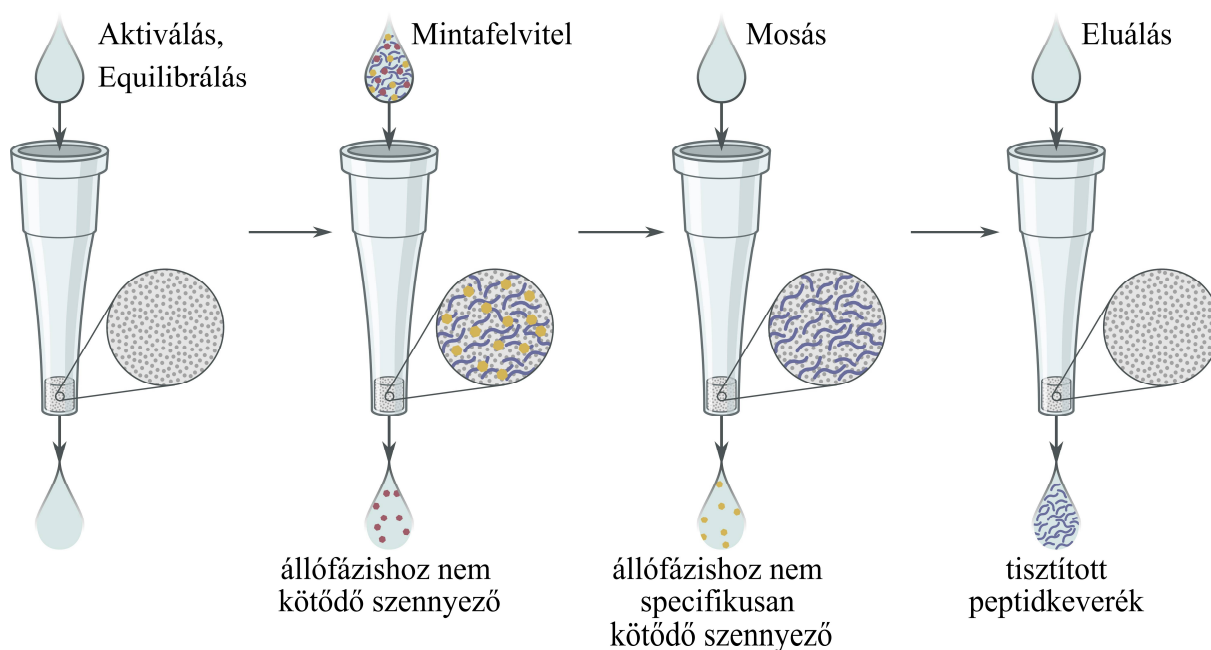
2.3.1. SPE lépései

Az állófázis és az alkalmazott oldatok megválasztására számos lehetőség van. A kereskedelmi forgalomban kapható állófázisok eltérnek a töltet mennyiségében (kolonna, pipettahegy), az elválasztás mechanizmusában (pl. London kölcsönhatás, dipólus-dipólus kölcsönhatás, hidrogénkötés, π - π kölcsönhatás, elektrosztatikus kölcsönhatás), a rajtuk történő oldat átáramoltatás technikájában (vákuummal vagy centrifugálással), továbbá abban is, hogy online vagy offline módban alkalmazhatóak-e. Ugyanakkor általánosan mindegyik SPE módszer a következő lépéseket tartalmazza.^[4, 30-32]

Először a mintafelvitelhez megfelelő állapotba kell hozni az állófázist, melynek első lépése az *aktiválás*, amit általában közepes elúciós erősségű oldószerezrel végeznek. Ennek hatására az állófázis funkciócsoportjai úgy koordinálódnak, hogy majd a mintafelvitelkor azok alkalmasak legyenek a lehető legerősebb kölcsönhatás kialakítására a tisztítandó komponenssel. Ezt követheti egy *mosási* lépés, amely során az állófázison esetlegesen jelenlévő szennyezőket távolítják el. Majd következik az *equilibrálás*, ekkor a mintafelviteli oldattal azonos összetételű oldattal kezelik az állófázist, így az a mintafelvitelhez szükséges állapotba

kerül.^[30] Utána felviszik az állófázisra a mintát alacsony elúciós erősségű oldószer(elegy) segítségével, ekkor a célkomponensek és a nem specifikusan kötődő komponensek kötődnek meg az állófázison. Ezt követi a *mosási* lépés, melynek célja az állófázison nem specifikusan megkötődött szennyezők eltávolítása. Végül az állófázison megkötődött célkomponenseket nagy elúciós erősségű oldószerrel *eluálják*.^[30] Az előbbieket összefoglalását a 3. ábra tartalmazza.

Peptidkeverékek tisztítására általánosan fordított fázisú SPE (pl. C₁₈-csoporttal módosított szilika állófázis) alkalmazható. Fordított fázis alkalmazása esetén a mintafelvitelt vizes közegben, míg az elúciót magas szerves oldószert tartalmazó közegben végzik.^[4, 30-32]



3. ábra Szilárdfázisú extrakció lépései

2.3.2. Peptidek SPE tisztításának hatékonyságát befolyásoló tényezők

Egy SPE módszer hatékonyságát számos tényező alapvetően meghatározza, pl. az állófázis típusa és alkalmazott oldószerrendszer, valamint megfelelő körülmények megválasztásával (pl. ionpárképzés, hőmérséklet, inkubálás) finomhangolható a módszer a nagyobb visszanyerés és azonosítás érdekében.

Állófázis típusa. Az állófázis felületének kémiai tulajdonságai jelentős mértékben befolyásolják a retenció mértékét. Emiatt azonos körülmények között azonos vegyületeken végzett SPE esetében pl. a HLB (*N*-vinil-pirollidon és divinil-benzol kopolimer) és a C₁₈ (C₁₈-csoporttal módosított szilika) állófázisok más mértékű retenciót biztosítanak. Továbbá az elválasztás hatékonyságát a funkcionális állófázisoknál (pl. alkil-csoporttal módosított

szilika) a felület funkcionálizálásának és a funkcionálizálás után megmaradó szilanol csoportok szubsztitúciójának módja, valamint a funkcionálizálás mértéke is befolyásolja. Ezért lehetséges, hogy két különböző gyártó C_{18} SPE állófázisa eltérő hatékonyságú.^[4, 29-32]

Mintafelviteli oldószer összetétele. A legtöbb peptid savas karakterű, izoelektromos pontjuk (IP) általában 2-5 közötti, $pH < 2$ oldatot használva a bázikus oldalláncú aminosavak bázikus csoportja protonálódik. Amennyiben olyan ionpárképző reagenst használnak, ami képes protonálni ezeket a bázikus csoportokat és emellett hidrofób láncot tartalmaz (pl. ecetsav (AA), trifluor-ecetsav (TFA), heptafluor-butánsav (HFBA)), akkor fordított fázisú SPE-nél növelhető a peptidek retenciója. A mintafelviteli oldathoz 0-20%-ban szerves oldószert (pl. acetonitril (ACN), metanol (MeOH)) adva elősegíthető az analit–állófázis közötti megfelelő kölcsönhatás kialakulása.^[30]

Minta–állófázis aránya. Amennyiben túl sok a minta az állófázis kötési helyeihez képest, akkor a mintában lévő peptidek egy része nem fog megkötődni az állófázison, így elveszik a mintának azon része. Ha pedig az előbbivel fordított eset áll fenn, akkor az analit egy része permanensen fog az állófázishoz kötődni.^[30]

Inkubálás, keverés. Mintafelvitelkor és elúciókor az állófázis oldószerral való inkubálásával, valamint, méretétől és kialakítástól függően, felkeverésével elősegíthető a minta állófázis kötőhelyeihez való kapcsolódása, illetve onnan történő lemosása.^[30]

Hőmérséklet. Alacsonyabb hőmérsékleten erősebb, magasabb hőmérsékleten gyengébb kölcsönhatás alakul ki az állófázis és az egyes komponensek között. Ezt oly módon lehet kihasználni, hogy mintafelvitelkor alacsonyabb, elúciókor magasabb hőmérsékletű oldószert használnak, így a lehető legerősebben megkötődnek a komponensek, ugyanakkor a lehető legnagyobb mértékben tudják eluálni azokat.^[4, 30]

Eluens mennyisége, minősége. Az elúciós lépésben a cél, hogy az állófázisról az azon megkötődött peptidek lehető legnagyobb részét lemossák. Egyrészt nagy elúciós erősségű eluenst alkalmaznak, ehhez 70-100%-ban (hidrofil peptidekhez kisebb, hidrofób peptidekhez nagyobb mennyiségben) szerves oldószert (pl. ACN, MeOH) kell tartalmaznia. Továbbá olyan komponensre is szükség lehet, amely csökkenti a peptidek ionpárkölcsönhatását az állófázissal. Ehhez olyan karbonsavakat használnak, mellyel a mintafelvitelhez használt karbonsavhoz képest kevésbé hidrofil jellegű (pl. a mintafelvitelhez HFBA-t alkalmaztak, akkor elúciós oldathoz TFA-t érdemes adni). Másrészt megnövelhetik az eluens mennyiségét, ekkor ugyan több peptid mosódik le az állófázisról, viszont az eluátum mennyisége is megnövekszik, ami miatt mintavesztés léphet fel, mert a megnövekedett térfogatú oldat nagyobb felületen érintkezik az eppendorf-csővel, továbbá az általában ezt követő bepárlásnál is nagyobb

valószínűséggel léphet fel további mintavesztés. Harmadrészt, ha nem egy, hanem több lépésben viszik fel ugyanazt az eluens mennyiséget, akkor hatékonyabb elúció érhető el.^[30]

2.3.3. Peptidek SPE tisztítási lehetőségei

Mivel az SPE gyors, aránylag olcsó, ezért a proteomikában széles körben alkalmazzák mintaelőkészítéseknel peptidkeverékek tisztítására, sólanítására. A 2. táblázatban össze gyűjtöttem néhány, a szakirodalomban korábban alkalmazott SPE módszert. A szakirodalmi módszerek főként a mintafelviteli és az elúciós pufferben térnek el, ugyanakkor az elúciós pufferek tekintetében a legváltozatosabbak.

2. táblázat Szakirodalomban használt peptid SPE tisztítómódszerek

Állófázis	Minta mennyisége	Összetétel	
		Mintafelviteli puffer	Elúciós puffer
Merck ZIPTIP® C ₁₈ SPE pipettahegy ^[33]	50 µg retina fehérje	0,1 V/V% TFA + 100 V/V% H ₂ O	0,1 V/V% TFA + 50 V/V% ACN + 50 V/V% H ₂ O
Thermo SOLAµ™ SPE HRP tányér ^[33]			100 V/V% MeOH
C ₁₈ MicroSpin kolonna ^[34]	50 µg tüdőszövet fehérje	0,1 V/V% TFA + 100 V/V% H ₂ O	0,1 V/V% TFA + 80 V/V% ACN + 20 V/V% H ₂ O
ZipTipµ C ₁₈ pipetta hegy ^[35]	0,75-5 µg emberi nyál	1 V/V% AA + 99 V/V% H ₂ O	50 V/V% ACN + 50 V/V% H ₂ O és 80 V/V% ACN + 20 V/V% H ₂ O
Oasis HLB µElution tányér ^[36]	emberi plazmából 150 µg fehérje	100 V/V% H ₂ O	80 V/V% ACN + 20 V/V% H ₂ O

2.4. Foszfoproteomika

A foszfoproteomika a proteomikának azon ága, amely a foszforiláció vizsgálatával foglalkozik. A foszforiláció során az ATP-ről egy foszfátcsoport, a kináz enzimek közreműködésével, valamely aminosav oldalláncához kapcsolódik pl. foszfátészter-, foszfoamidát-, vagy foszfokarboxilát-kötéssel. A folyamat reverzibilis, az előbbivel ellentétes folyamat a *defoszforiláció*, melyet a foszfatáz enzimek végeznek. Foszfátcsoport beépülése szerinen (Ser) a leggyakoribb, ennél jóval kevésbé gyakori treoninon (Thr) és még kevésbé gyakori tirozinon (Tyr), relatív arányuk Ser:Thr:Tyr = 11,2:2,5:1.^[37] Ezekhez képest jóval

ritkábban cisztein, lizin, hisztidin, arginin, aszparaginsav, glutaminsav oldalláncára is beépülhet foszfátcsoporthoz.^[2, 37, 38]

A foszforilációnak jelentős szerepe van pl. az egyed fejlődésében, növekedésében, öregedésében, az immunrendszer szabályzásában, így érthető, hogy vizsgálata nagyon fontos a biológiai folyamatok megértéséhez.^[2, 12]

2.4.1. Foszfoproteomika kihívásai

A foszforiláció vizsgálta számos kihívást állít a kutatók elé. A tömegspektrometriás mérésnél egyrészt ionszupresszió következhet be két ok miatt: 1) a foszforilált peptid (foszfopeptid) kisebb mennyiségben fordul elő a nem foszforiláltakhoz képest, 2) a foszfoproteomikai vizsgálatoknál is pozitív ionizációs módban végzik a mérést, a foszfátcsoporthoz savas karakterű, így nehezebben vesz fel protont, azaz a foszfopeptid ionizálása nehezebb, mint a nem foszforiláltaké. Másrészt DDA mérési módban (részletesebben 2.2.1. alfejezet) a nagyobb mennyiségben jelen lévő, nem foszforilált peptidről készül elsősorban MS/MS felvétel. Ezek a problémák úgy mérsékelhetők, ha a HPLC-MS/MS mérést megelőzően a minta foszfopeptidjeinek relatív koncentrációját növelik a nem foszforilált peptidhez képest, úgynevezett dúsítást végezve.^[2, 12]

2.4.2. Foszfopeptid dúsítási lehetőségek

A foszfoproteomikai vizsgálatok döntő többségét „*bottom-up*” módszerrel végzik. A mintaelőkészítés során meg kell növelni a foszfopeptid relatív mennyiségét a mintában, ezt végezhetik fehérje szinten, vagy peptid szinten, mindegyik kivitelezési módnak megvannak a maga előnyei és hátrányai, ugyanakkor a peptid szinten történő dúsítás terjedt el szélesebb körben. Az erre kifejlesztett módszerek közül néhányat a 3. táblázat tartalmaz. Azokat a módszereket, melyek kevésbé specifikus kölcsönhatáson alapulnak (pl. elektrosztatikus, hidrofíl interakció), frakcionálásra, amelyek specifikusabb kölcsönhatáson alapulnak (pl. antigén-antitest, Lewis sav-bázis), affinitás dúsításra használják. Mind a frakcionálási, mind az affinitás dúsítási eljárások kivitelezhetők online és offline módban, ugyanakkor általában a frakcionálási eljárásokat online, míg az affinitási dúsítási eljárásokat offline módban szokták használni.^[39, 40]

3. táblázat Példa foszfopeptid frakcionálás, dúsitó módszerekre és azok elvére

Módszer		Elválasztás elve
neve	célja	
Erős anioncserélő (SAX) ^[38-40]	Frakcionálás	Az állófázis felületén pozitív töltésű bázikus csoportok kölcsönhatnak a semleges-lúgos közegben negatív töltésű peptidekkel. A foszfopeptidek a legnegatívabb töltésűek.
Erős kationcserélő (SCX) ^[38-40]		Az állófázis felületén lévő deprotonált savas csoportok kölcsönhatnak a savas közegben pozitív töltésű peptidekkel. A foszfopeptidek a legkevésbé pozitív töltésűek.
Gyenge anioncserélő (WAX) ^[12]		Az elve ugyanaz, mint a SAX esetében csak az állófázis felületén nem erősen, hanem gyengén bázikus csoportok vannak, így a pH változtatásával befolyásolható az állófázis felületének protonáltsága.
Gyenge kationcserélő (WCX) ^[12]		Az elve ugyanaz, mint a SCX esetében csak az állófázis felületén nem erősen, hanem gyengén savas csoportok vannak, így a pH változtatásával befolyásolható az állófázis felületének protonáltsága.
Hidrofil interakciós kromatográfia (HILIC) ^[39, 40]		Az állófázis felületén egy vízben gazdag réteg alakul ki, a komponensek megoszlanak a hidrofilitás alapján a szerves oldószer és a vízben gazdag felület között (a foszfopeptidek a foszfátcsoport miatt hidrofilebbek, mint a nem foszforilált peptidek).
Elektrosztatikus taszítás–hidrofil interakciós kromatográfia (ERLIC) ^[38, 39]		Az állófázis ioncserélő csoportokat tartalmaz, a mozgófázis víz-szerves oldószer elegye, az állófázis felületén egy vízben gazdag réteg alakul ki. Kevés víz jelenlétében az analit–állófázis között hidrofil kölcsönhatás a domináns, több víz jelenlétében az állófázissal azonos töltésű komponensek elektrosztatikus taszítása válik dominánssá.
Immun-precipitáció ^[38-40]	Dúsítás	Antitest–antigén kölcsönhatás.
Immobilizált fém affinitás kromatográfia (IMAC) ^[38, 39]		Szilárd fázisban lévő helyhez kötött fémionokkal kölcsönhatnak a folyadékfázisban lévő negatív töltésű foszfátcsoportok.
polyMAC ^[40]		Folyadék fázisban polimerhez kötött fémionokkal kölcsönhatnak a folyadékfázisban lévő negatív töltésű foszfátcsoportok, majd a polimert kicsapják.

3. táblázat Folytatása

Módszer		Elválasztás elve
neve	célja	
Phos-Tag ^[40]	Dúsítás	IMAC elvével azonos. Az állófázis agaróz gélhez kötött Zn^{2+} -t tartalmaz.
Fém-oxid affinitás kromatográfia (MOAC) ^[12, 38]		Szilárd fázisban lévő protonált fém-oxidokkal kölcsönhatnak a folyadékfázisban lévő negatív töltésű foszfátcsoportokkal.
SIMAC		Először egy IMAC utána egy MOAC dúsítást végeznek.
Kicsapás szervesen ionokkal ^[38]		A foszfopeptidek csapadékot képeznek Ca^{2+} -, Ba^{2+} -ionokkal.
Hidroxi-apatit kromatográfia (HAP) ^[40]		$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ szelektíven köti a foszfopeptideket.
Kémiai módosítás ^[40]		A foszfopeptidekből valamilyen kémiai reakció(sor) révén származékot képeznek.

A két legelterjedtebb módszer a MOAC és az IMAC, a két módszer elve hasonló, pozitív töltésű állófázissal kölcsönhatnak a foszfátcsoportok. Ugyanakkor míg az IMAC komplexált több vegyértékű fémionokat, addig a MOAC fém-oxidokat tartalmaz. A frakcionálási és dúsítási eljárások kombinációjával úgynevezett multidimenziós eljárásokat is kifejlesztettek, ugyanakkor ezek mintaelőkészítése több lépésből áll, ezért időigényesebb és nagyobb mintamennyiség szükséges ezekhez. Kutatásunk során MOAC módszerrel végeztünk dúsítást, így a következőkben ezt mutatom be részletesebben.^[12, 39]

Fém-oxid affinitás kromatográfia (MOAC). A MOAC módszerek állófázisa amfoter fém-oxid, pl. TiO_2 , ZrO_2 , Ga_2O_3 , Fe_3O_4 , Al_2O_3 . A TiO_2 terjedt el a legjobban, ugyanis ez alkalmas egyszeresen és többszörösen foszforilált peptidek reverzibilis megkötésére, mivel a foszfopeptidekkel közepes erősségű kötést létesít. A TiO_2 morfológiájának változtatásával az állófázis kapacitása, specificitása befolyásolható^[12, 40].

Mintafelvitelkor fontos, hogy a nem specifikus savas oldalláncú aminosavakat tartalmazó nem foszforilált peptidek állófázishoz való kötődését meggátolják. Amennyiben a mintafelviteli oldat pH-ját úgy választják meg, hogy a savas oldalláncú peptidek karboxilcsoportja ne tudjon deprotonálódni, viszont a foszfátcsoport deprotonált állapotban legyen, akkor az állófázissal csak a foszfopeptidek tudnak kölcsönhatni. A legnagyobb szelektivitás eléréséhez az összes savas oldalláncú peptidnek protonált formában kell lennie, ehhez 1-1,5-nél kisebb pH szükséges.^[40] Míg a legnagyobb érzékenység eléréséhez az összes foszfátcsoporthoz

deprotonált állapotban kell lennie, ehhez 3-3,5-nél nagyobb pH szükséges.^[40] A gyakorlatban az oldat pH-ját általában 2,5-2,7 közötti értékre állítják be, melyhez leggyakrabban TFA-t szoktak használni.^[40] Emellett a mintafelviteli oldathoz adagolt ACN képes a hidrofób kölcsönhatások gátlására, sőt ennek hatására a deprotonált foszfátcsoportok és a protonált karboxilcsoportok száma is megnő, így javítva a dúsítás szelektivitását.^[40] A nem specifikus kölcsönhatások kialakulását olyan reagensekkel is gátolni lehet, melyek pK_s értéke a foszfopeptidek és a mintában lévő nem foszforilált peptidek pK_s értéke között van. Erre például a dihidroxi-benzoészav (DHB), szalicilsav, citromsav, ftálsav alkalmas.^[12, 40]

Elúciónál az állófázis-minta közötti kölcsönhatás megszüntetésére bázikus körülményeket alkalmaznak, erre lehet szerves (pl. pirrolidin), vagy szervetlen (pl. NH_3) bázist is használni. Ugyanakkor, ha az elúciót követően a HPLC-MS/MS mérés előtt nem végeznek tisztítást, akkor az eluensnek MS kompatibilisnek kell lennie.^[12, 40]

2.4.3. Foszfopeptidek tisztítási lehetőségei

Amennyiben a dúsítás elúciós lépésében alkalmazott eluens nem MS kompatibilis vagy lehetséges, hogy az elúciós lépésben még olyan szennyezők is jelen vannak az állófázison, melyek zavarják a HPLC-MS/MS mérést, vagy kárt okoznak a műszerben, akkor szükséges egy tisztítási lépés a HPLC-MS/MS mérés előtt. A kutatás során erre offline SPE-t használtunk. A szakirodalomban korábban ilyen célra alkalmazott eljárásokat a 4. táblázatban foglaltam össze. A szakirodalomban a mintafelviteli pufferek, elúciós pufferek tekintetében változatos módszerek találhatók.

4. táblázat Szakirodalomban használt foszfopeptid SPE tisztítómódszerek

Állófázis	Minta mennyisége	Összetétel	
		Mintafelviteli puffer	Elúciós puffer
Saját készítésű C_{18} SpinTip ^[33]	1 µg patkány simaizom emésztmény és HeLa triptikus emésztmény foszfopeptidjei	0,1 V/V% HFBA + 100 V/V% H_2O	0,1 V/V% TFA + 70 V/V% ACN + 30 V/V% H_2O és
Thermo C_{18} Kolonna ^[33]			0,1 V/V% TFA + 70 V/V% ACN + 30 V/V% H_2O és
Saját készítésű HLB SpinTip ^[33]		2 V/V% H_3PO_4 + 98 V/V% H_2O	100 V/V% MeOH
Empore TM SDB-XC extrakciós lemez ^[41]	100 µg HeLa sejvonal foszfodúsításnak alávetve	0,1 V/V% TFA + 0-4 V/V% ACN + 100-96 V/V% H_2O	0,1 V/V% TFA + 80 V/V% ACN + 20 V/V% H_2O

4. táblázat Folytatása

Állófázis	Minta mennyisége	Összetétel	
		Mintafelviteli puffer	Mintafelviteli puffer
PolyWAX polimer gyenge anioncserélő ^[42]	5 µg magzati szarvas- marha szérum	10 mM nátrium- metil-foszfónát + 30 V/V% H ₂ O + 70 V/V% ACN pH = 2.0	1 V/V% TFA + 9 V/V% H ₂ O + 90 V/V% ACN

2.5. Proteomika és foszfoproteomika szerepe a prosztatatarák kutatásában

A betegség következtében elhunytak esetén a fő halálozási ok a keringési rendszeri megbetegedések után a rosszindulatú daganatos megbetegedések.^[43] A prosztatatarák a daganatos megbetegedésben szenvedő férfiak körében a világon a második, az Európai Unióban a harmadik leggyakoribb előfordulás.^[44, 45]

A prosztatataráknak több fajtája ismert, a leggyakoribb típus a prosztatata sejteiben kifejlődő, úgynevezett acináris adenokarcinóma.^[46] Az életkor előrehaladtával a prosztatatarák kialakulásának valószínűsége jelentősen nő^[45], így rendkívül fontos olyan módszerek kidolgozása, melyek segítségével prognosztizálható a daganat kialakulása és idejében elkezdhetőek a szükséges kezelések.

Manapság a prosztatatarák monitorozására a prosztatata specifikus antigén (PSA) vérben mért szintjét alkalmazzák.^[47] A PSA a prosztatata által termelt fehérje, mely részben a véráramba kerül. A PSA nem kellően specifikus, ugyanis vérben mérhető szintje nem csak prosztatatarák, hanem pl. gyulladás, jóindulatú prostatamegnagyobbodás esetén is megváltozik.^[48, 49] Emiatt sokszor feleslegesen végeznek biopsziát, ezért új/kiegészítő diagnosztikai és prognosztikai markerek azonosítása kulcsfontosságú.

A prosztatatarák molekuláris vizsgálata alapvető fontosságú a tumor fejlődésének jobb megértéséhez, és új terápiás biomarkerek azonosításához. Az elmúlt években számos tanulmány jelent meg a prosztatatarák potenciális diagnosztikai biomarkereiről.^[48, 50, 51]

2.5.1. Proteomika

2021-ben egy átfogó tanulmányban foglalták össze a prosztatatarák proteomikai kutatásainak eredményeit, kiemelve a leggyakrabban érintett biológiai folyamatokat, például a sejtadhéziót, a citoskeletonális változásokat, az RNS-feldolgozást, a telomerhosszabbítást, valamint a metabolikus és jelátviteli útvonalakat^[52]. Egy korábbi vizsgálatban 75 olyan fehérjét azonosítottak szövet minták elemzésével, amelyek expressziós szintje jelentősen eltért a nem

tumoros és a különböző grádusú tumoros minták között.^[45] A rákos szövetekben alulexpresszált fehérjék többsége sejtszerveződési funkcióval, míg a felulexpresszált fehérjék többsége metabolikus folyamatokkal volt kapcsolatba hozható.^[45]

2.5.2. Foszfoproteomika

Az orvosbiológia területén jelenleg kiemelt figyelmet fordítanak a kináz jelátviteli útvonalakra, mivel ezek potenciális terápiás célpontként szolgálhatnak.^[53, 54] A prosztatatarák jellemzésére foszfoproteomikai elemzéseket már korábban is végeztek, ami révén több foszforilációs eseményt összefüggésbe hoztak a gyógyszerrezisztenciával és a betegség előrehaladásával.^[55-58] A prosztatatarák kiújulásával kapcsolatba hozott^[59] protein kináz C lambda (PRKCI) például humán onkogénként azonosított fehérje, amely szükséges a humán rákos sejtek túléléséhez, inváziójához és növekedéséhez ^[60].

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Felhasznált anyagok

- Acetonitril (ACN, $\geq 99,9\%$): VWR Chemicals BDH[®]
- Ammónia (NH₃, 25%): Reanal
- Ammónium-bikarbonát (NH₄HCO₃): Sigma-Aldrich
- Citromsav vízmentes (CA): Sigma-Aldrich
- Ecetsav (AA, 99%): Fluka
- Etanol (EtOH, $\geq 99,7\%$): VWR Chemicals BDH[®]
- Foszforsav-oldat (H₃PO₄, 85 m/m%): Sigma-Aldrich
- Glicerin: Sigma-Aldrich
- Hangyasav (FA): Fluka
- HeLa fehérje emésztmény standard (HeLa): Thermo Scientific
- Heptafluor-butánsav (HFBA): Sigma-Aldrich
- Jód-acetamid (IAA, $>99\%$): Sigma-Aldrich
- LC-MS tisztaságú víz (H₂O): Sigma-Aldrich
- LysC-Tripszin (MS tisztaságú): Promega Madison
- Metanol (MeOH, $\geq 99,8\%$): VWR Chemicals BDH[®]
- Nátrium-citrát dihidrát ($\geq 99,5\%$): Sigma-Aldrich
- RapiGest[™] SF (RapiGest): Waters
- Trifluor-ecetsav (TFA): Sigma-Aldrich
- Tripszin (MS tisztaságú): Promega Madison
- Xilol: VWR Chemicals BDH[®]

3.1.1. Felhasznált minták

A proteomika SPE tisztító módszerfejlesztéshez HeLa sejtvonal triptikus emésztményét (Thermo Scientific[™]) használtuk, amely a proteomikában egy gyakran alkalmazott standard minta.

A foszfoproteomikai módszerfejlesztéshez használt 24 db formalin-fixált paraffinba ágyazott (FFPE) 10 μ m vastagságú tüdő adenokarcinóma szövetmetszetet a Pécsi Tudomány Egyetem Általános Orvostudományi Karának Patológiai Intézete biztosította. Etikai engedély száma: IV/2567-4/2020/EKU.

A prosztataadaganat proteomikai vizsgálatához használt 3 db tumoros 2 µm vastagságú FFPE prosztata metszetet a Duisburg-Essen Egyetem Orvostudományi Karának Urológia Intézete biztosította. Etikai engedély száma: 21-9991-BO.

3.2. Módszerfejlesztés peptidek SPE tisztítására

A módszerfejlesztéshez 500 ng HeLa-t használtunk fel mintánként. A peptidek tisztítására összesen 8 módszert hasonlítottunk össze, 4 állófázis és 6 oldószerrendszer kombinációjával (5. táblázat). Mindegyik módszerrel 5-5 párhuzamos tisztítást végeztünk, emellett 5 párhuzamos tisztítatlan mintát használtunk kontrollként. A használt állófázisok a Thermo Scientific™ gyártótól a Pierce™ C₁₈ Column és a Pierce™ C₁₈ Spin Tips, valamint az Affinisep gyártótól az AttractSPE® Disks Tips C₁₈ és AttractSPE® Disks Tips HLB termékek. A C₁₈ és HLB állófázisok különböző elven működnek, ezért különböző oldószerrendszert használtam hozzájuk. Az *Oldószerrendszer II* a C₁₈ töltetű állófázisokhoz, az *Oldószerrendszer V* a HLB töltetű állófázishoz korábban a kutatócsoportban fejlesztett, míg az *Oldószerrendszer VI* a HLB töltetű állófázishoz a gyártó által fejlesztett protokollon alapult. Az *Oldószerrendszer II*-höz képest az *Oldószerrendszer I, III-IV* kis változtatásokat tartalmaz, pl. más az ionpárhépző reagens (*I*: HFBA, *II-III*: TFA, *IV*: AA) minősége, más az elúciós oldószer ACN : H₂O aránya (*I-II*: 70% ACN + 30% H₂O, *III-IV*: 80% ACN + 20% H₂O). Míg a „Column” megnevezésű kolonna több, addig a „Tips” megnevezésű pipettahegy kevesebb töltetet tartalmaz, ezért egyrészt az előbbihez nagyobb mennyiségű oldószert, továbbá hosszabb ideig tartó nagyobb fordulatszámú centrifugálást alkalmaztunk.

5. táblázat Proteomikai tisztítómódszerek. A táblázatban szereplő százaléktételek térfogatszálalékban értendők

Oldószer	Oldószerrendszer I			Oldószerrendszer II			Oldószerrendszer III	
Módszer	Összetétel	T-Col-HFBA		T-Col-TFA-I	T-Tip-TFA-I	A-Tip-TFA-I	T-Tip-TFA-II	
Állófázis		Pierce™ C ₁₈ Column		Pierce™ C ₁₈ Column	Pierce™ C ₁₈ Spin Tips	AttractSPE® Disks Tips C ₁₈	Pierce™ C ₁₈ Spin Tips	
Centrifugálás ciklusonként		2000 rpm / 2 perc		2000 rpm / 2 perc	1000 g / 1 perc	1000 g / 1 perc	1000 g / 1 perc	
Állófázis előkészítése	50% MeOH + 50% H ₂ O	2 × 200 µL	50% MeOH + 50% H ₂ O	2 × 200 µL	2 × 20 µL		80% ACN + 20% H ₂ O + 0,1% TFA	
	95% H ₂ O + 5% ACN + 0,5% TFA	2 × 200 µL	95% H ₂ O + 5% ACN + 0,5% TFA	2 × 200 µL	2 × 20 µL			
	100% H ₂ O + 0,1% HFBA	2 × 200 µL	100% H ₂ O + 0,1% TFA	2 × 200 µL	2 × 20 µL			
	100% H ₂ O + 0,1% HFBA	50 µL	100% H ₂ O + 0,1% TFA	50 µL	50 µL			
Állófázis mosása	100% H ₂ O + 0,1% HFBA	2 × 100 µL	100% H ₂ O + 0,1% TFA	2 × 100 µL	2 × 20 µL		100% H ₂ O + 0,1% TFA	2 × 20 µL
Elúció	70% ACN + 30% H ₂ O + 0,1% TFA	2 × 50 µL	70% ACN + 30% H ₂ O + 0,1% TFA	2 × 50 µL	2 × 20 µL		80% ACN + 20% H ₂ O + 0,1% TFA	2 × 20 µL
	70% ACN + 30% H ₂ O + 0,1% FA	50 µL						

5. táblázat Folytatása

Oldószer	Oldószerrendszer IV			Oldószerrendszer V			Oldószerrendszer VI		
Módszer	Összetétel	A–Tip–AA		Összetétel	HLB–MeOH		Összetétel	HLB–ACN	
		AttractSPE® Disks Tips C ₁₈			AttractSPE® Disks Tips HLB			AttractSPE® Disks Tips HLB	
		1000 g / 1 perc			1000 g / 1 perc			1000 g / 1 perc	
Állófázis Centrifugálás ciklusonként	100% MeOH	2 × 20 µL		100% MeOH	2 × 100 µL		100% ACN	2 × 100 µL	
	80% ACN + 20% H ₂ O + 0,5% AA	2 × 20 µL							
	100% H ₂ O + 0,5% AA	2 × 20 µL		100% H ₂ O	2 × 100 µL		100% H ₂ O + 0,5% AA	2 × 100 µL	
Mintafelvétel	100% H ₂ O + 0,5% AA	50 µL		98% H ₂ O + 2% H ₃ PO ₄	50 µL		98% H ₂ O + 2% H ₃ PO ₄	50 µL	
Állófázis mosása	100% H ₂ O + 0,5% AA	2 × 20 µL		95% H ₂ O + 5% MeOH	3 × 50 µL		100% víz	3 × 50 µL	
Elúció	80% ACN + 20% H ₂ O + 0,5% AA	2 × 20 µL		100% MeOH	2 × 50 µL		50% H ₂ O + 50% ACN	2 × 50 µL	

3.2.1. nanoHPLC-MS/MS mérés

A mintákat 8 μL *Injektálási oldószerben* (98 V/V% H_2O + 2 V/V% ACN + 0,1 V/V% FA) oldottuk fel, amelyből 5 μL -t injektáltunk. A minták mérését Waters ACQUITY UPLC H-Class rendszerrel (Waters, Milford, MA, USA) kapcsolt Bruker Maxis II Q-TOF (Bruker, Bréma, Németország) végeztük.

A folyadékkromatográfiás méréshez Acquity M-Class BEH130 C_{18} töltetes 1,7 μm , 75 $\mu\text{m} \times 250 \text{ mm}$ kapilláris kolonnát (Waters, Milford, MA, USA), a trappeléshez Acclaim PepMap100 C_{18} töltetes (Waters, Milford, MA, USA) 100 $\mu\text{m} \times 20 \text{ mm}$ Nano Trap kolonnát használtunk. Az A eluens: 0,1 V/V% hangyasav (FA) + 100 V/V% H_2O , a B eluens: 0,1 V/V% FA + 100 V/V% ACN volt. A trappelést 3 percig 15 μL /perc áramlási sebesség mellett 99% A eluenssel végeztük. Az alkalmazott gradiens program a következő volt: 1 percig 12% B áramoltatás, 12% B $\rightarrow$ 25% B-re (25,5 perc alatt), 25% B $\rightarrow$ 45% B (10 perc alatt), 45% B $\rightarrow$ 95% B (10 perc alatt), 95% B-vel mosás (10 perc). A gradiensprogramhoz 300 nL/perc áramlási sebességet alkalmaztunk.

A tömegspektrometriás mérést pozitív ionizációs módban végeztük, CaptiveSpray nanoBooster ionforrással, 1,3 kV kapillárisfeszültség mellett. A nanoBooster szárítógáz 0,2 bar-os 3 L/perc áramlási sebességű 150 $^{\circ}\text{C}$ -os volt. Az Agilent Technologies cégtől vásárolt kis koncentrációjú kalibráló keverék direkt injektálásával külső kalibrációt végeztünk, továbbá minden minta mérése előtt belső tömegkalibrációt végeztünk nátrium-formiát használatával.

A tömegspektrometriás mérés paraméterei: m/z tartomány: 150-2200 Th; ciklusidő: 2,5 s, MS spektrum felvételi gyakorisága: 3 Hz. A CID fragmentáció után a nagy intenzitású prekursorokból származó ionokról 16 Hz, kis intenzitású prekursorokból származó ionokról 4 Hz gyakorisággal készült spektrumok felvétel. A mérésből az egyszeres töltésű peptideket kizártunk. A CID ütközéshez szükséges energiát a vezérlőszoftver határozta meg m/z és töltés alapján.

3.2.2. Adatelemzés

A tömegspektrumok alapján a peptidek és fehérjék azonosítását a ByonicTM szoftverrel^[61] végeztük, ehhez a UniProt^[62] oldalon (www.uniprot.org) 2024.02.22-én elérhető 82428 db emberi fehérjeszekvenciát tartalmazó adatfájlt, használtuk. A beállításoknál megadtuk, hogy az emésztőenzim által kihagyott hasítási helyek maximális száma 2 lehet, továbbá oxidáció és acetiláció, ammóniavesztés, karbamidometiláció, glutamin glutamáttá és piroglutamáttá átalakulása PTM lehetett a peptideken.

A Byonicból származó adatok kiértékelését az RStudio szoftverrel^[63] végeztük. Az azonosított peptidekből először kiszűrtük azokat, melyek több, mint 5%-os valószínűséggel (megmaradó adatokra p -érték $< 0,05$) hibásan kerülhettek azonosításra.^[61] Azokat a fehérjéket tekintettük azonosítottaknak, amihez 2 egyedi peptid és p -érték $< 0,01$ tartozott. Az adatelemzés során meghatároztuk az azonosított peptidek izoelektomos pontját, ehhez a „seqinr”^[64] csomagban lévő kalkulátort használtuk. Valamint meghatároztuk a peptidek GRAVY értékét, egy online kalkulátort (GRAVY CALCULATOR) segítségével.^[65] A vizualizációhoz a „ggplot2”^[66] és a „VennDiagram”^[67] csomagokat használtuk.

3.3. Módszerfejlesztés foszfopeptidek SPE tisztítására

3.3.1. FFPE metszetek előkészítése

Metszet előkezelése. A metszeteket 2 órán át 60 °C-on hőkezeltük, hogy megelőzzük a szövetek leválását a tárgylemezről. Utána eltávolítottuk a paraffinréteget a metszetek különböző polaritású oldószerekbe merítésével: 1) xilol (5 perc), 2-3) 100% EtOH (3 perc), 4) 90 V/V% EtOH – 10 V/V% víz (3 perc), 5) 70 V/V% EtOH – 30 V/V% víz (3 perc), 6) 10 mM koncentrációjú NH_4HCO_3 -oldat (5 perc), 7) víz (1 perc). A keresztkötések megszüntetésére antigén előhívást végeztünk: a mintákat 80-85 °C-on hőkezeltük citromsav/nátrium-citrát pufferben (24,4 g trinátrium-citrát + 4 g citromsav (CA) / 1 l H_2O , pH = 6) 30 percig.

Felületi emésztés. A metszetekre először 3 μL szolubilizáló-alkiláló oldatot (5 mM ditiotritol (DTT) + 0,1 V/V% RapiGestTM SF (RapiGest) felületaktív anyag + 20 V/V% glicerín + 80 V/V% H_2O) vittünk fel, majd 55 °C-on inkubáltuk 20 percig. A RapiGest a fehérjék szolubilizálásáért, a DTT a kénhidak redukálásáért felelős.

A tiolcsoportokat jód-acetamidot (IAA) tartalmazó oldattal (25 mM NH_4HCO_3 + 10 mM IAA + 20 V/V% glicerín + 80 V/V% H_2O) szobahőmérsékleten, fénytől elzárva 20 percig alkiláltuk.

Ezt követően öt ciklusban végeztük az emésztést, két körben 3-3 μL LysC-Tripsin keveréket tartalmazó (40 ng/ μL LysC-Tripsin + 50 mM NH_4HCO_3 + 15% glicerín + 85 V/V% H_2O) oldatot vittünk fel a metszetekre, majd körönként 40 percig 37 °C-on inkubáltuk azokat. Utána három körben 3-3 μL tripsint tartalmazó (50 mM NH_4HCO_3 + 200 ng/ μL Tripszin + 100 V/V% H_2O) oldatot pipettáztunk a metszetekre, és körönként 40 percig 37 °C-on tartottuk azokat. Az enzimátikus emésztést minden ciklusát párás légkörben végeztünk. A szövetekről a peptidek kivonását öt körben végeztük 3-3 μL AA-tartalmú (10 V/V% AA + 90 V/V% H_2O) oldattal. Ezt követően a mintákat centrifugális vákuum-bepárlóval beszáritottuk.

Proteomikai tisztítás. A mintákat négyesével egyesítettük, majd az így kapott 6 mintán végeztük a tisztítást, mivel így gyorsabban kivitelezhető volt a tisztítás. Ehhez a 3.2. *alfejezetben* bemutatott *T-Col-HFBA* módszert (5. táblázat) használtuk. A mintákat centrifugális vákuumbepárlóval szárítottuk be.

Foszfopeptidek dúsítása. A dúsításhoz Thermo Scientific™ gyártó Pierce™ TiO₂ Phosphopeptide Enrichment Tips kolonnát használtuk. Azoknak a lépéseknek a végén, ahol más értéket nem írtam ott 2 percig 3000 g-n centrifugáltunk. Először két körben 50-50 µL *Mosópufferrel* (40 V/V% ACN + 0,1 V/V% TFA + 60 V/V% H₂O), majd pedig ismét két ciklusban 50-50 µL *Mintafelviteli pufferrel* (50 mM CA + 80 V/V% ACN + 1,5 V/V% TFA + 18,5 V/V% H₂O) kondicionáltuk a kolonnát. Utána a 150 µL *Mintafelviteli pufferben* feloldott mintákat felvittük az állófázisra, majd a maximális megkötődés érdekében az átfolyó oldatot ismét felvittük az állófázisra, mindkét lépésnél 10 percig 1000 g-n centrifugáltunk. Az állófázist két körben 50-50 µL *Mosópufferrel* mostuk. Az eluáláshoz egy körben 150 µL *Elúció I puffert* (80 V/V% ACN + 4 V/V% NH₃ + 16 V/V% H₂O), majd két körben 50-50 µL *Elúció II puffert* (4 V/V% NH₃ + 96 V/V% H₂O) használtunk, mindhárom ciklusnál 5 percig 1000 g-s fordulatszámon centrifugáltunk.

Végül az így kapott mintákat egyesítettük, hogy homogén kiindulási mintánk legyen a módszerfejlesztéshez, majd ezt 6 egyenlő részre osztottuk és liofilizáltuk őket.

3.3.2. Foszfopeptidek tisztítása

A foszfopeptidek tisztítására összesen 5 módszert hasonlítottunk össze, 4 állófázis és 3 oldószerrendszer kombinációjával (6. táblázat). Az alkalmazott állófázisok részben azonosak a 3.2. *fejezetben* bemutatottakkal, a *T-Col-HFBA*, *HLB-MeOH*, *HLB-ACN* módszerek teljes mértékben azonosak az 5. táblázat bemutatott módszerekkel. További két módszer esetén (*T-Tip-HFBA*, *A-Tip-HFBA*) pedig a *T-Col-HFBA* proteomikai módszernél használt oldószerrendszert alkalmaztunk. Mindegyik módszerrel 5 párhuzamos tisztítást végeztünk, emellett 5 párhuzamos tisztítatlan kontroll mintát is készítettünk.

3.3.3. nanoHPLC-MS/MS mérés

Ezt a proteomika módszerfejlesztésnél (3.2.1. *alfejezet*) leírtakkal azonos módon végeztük. Annyi különbséggel, hogy a gradiens program a következő volt: 1 percig 12% B áramoltatás, 12% B → 25% B-re (25,5 perc alatt), 25% B → 45% B (10 perc alatt), 45% B → 95% B (1 perc alatt), 95% B-vel mosás (10 perc).

6. táblázat Foszfopteomikai tisztítómódszerek. A táblázatban szereplő százaléktételek térfogatszázalékban értendők

Oldószer	Oldószerrendszer I				Oldószerrendszer II			Oldószerrendszer III		
Módszer	T-Col-HFBA	T-Tip-HFBA	A-Tip-HFBA		Összetétel		HLB-MeOH	Összetétel		HLB-ACN
Állófázis	Pierce™ C ₁₈ Column	Pierce™ C ₁₈ Spin Tips	AttractSPE® Disks Tips C ₁₈		1000 g / 1 perc		AttractSPE® Disks Tips HLB	Disks Tips HLB		AttractSPE® Disks Tips HLB
Centrifugálás ciklusonként	2000 rpm / 2 perc	1000 g / 1 perc	1000 g / 1 perc		1000 g / 1 perc		1000 g / 1 perc	1000 g / 1 perc		1000 g / 1 perc
Állófázis előkészítése	Összetétel	2 × 200 µl		2 × 20 µl	100% MeOH		2 × 100 µl	100% ACN		2 × 100 µl
	50% MeOH	2 × 200 µl		2 × 20 µl	5% ACN + 0,5% TFA		2 × 100 µl	0,5% AA		2 × 100 µl
	0,1% HFBA	2 × 200 µl		2 × 20 µl	100% víz		2 × 100 µl	2% H ₃ PO ₄		50 µl
Minta felvitel	0,1% HFBA	50 µl	50 µl	2 × 20 µl	2% H ₃ PO ₄		50 µl	100% víz		3 × 100 µl
Állófázis mosása	50% MeOH	2 × 100 µl	2 × 100 µl	2 × 20 µl	5% MeOH		3 × 50 µl	50% ACN		2 × 50 µl
	70% ACN + 0,1% TFA	2 × 50 µl	2 × 50 µl	2 × 20 µl	100% MeOH		2 × 50 µl	50% ACN		2 × 50 µl
Elúció	70% ACN + 0,1% FA	1 × 50 µl	1 × 50 µl	1 × 20 µl						

3.3.4. Adatelemzés

A tömegspektrumok alapján a peptidek és fehérjék azonosítását a ByonicTM szoftverrel^[61] végeztük, ehhez a UniProt^[62] oldalon (www.uniprot.org) 2024.02.22-én elérhető 82428 db emberi fehérjeszekvenciát tartalmazó adatfájlt, használtuk. A beállításoknál megadtuk, hogy szerin, treonin, és tirozin foszforilációt keressen, egy peptid maximum 3 foszforilációt tartalmazhatott.

A Byonicból származó adatok kiértékelését a proteomika módszerfejlesztésnél (3.2.2. *alfejezet*) leírtakkal hasonló módon végeztük.

3.4. Prosztatametszetek vizsgálata

3.4.1. FFPE metszetek előkészítése

A kutatás további részében a két kifejlesztett tisztítómódszer használatával végeztük 2 μ m vastagságú prosztatametszetek vizsgálatát. A metszetek 3.3.1. *alfejezetben* leírtak szerint elkészítettük, majd felületi emésztést végeztünk azokon, majd az így kapott peptidkeveréket a 4.1. *alfejezetben* kifejlesztett *A-Tip-TFA-I* proteomikai tisztításnak vetettük alá. Utána az 3.3.1. *alfejezetben* bemutatott foszfoproteomikai dúsítással két frakcióra osztottuk a mintáinkat, egy foszfopeptidekben dúsítottra és egy proteomika frakcióra. A foszfopeptidekben dús frakciót a 4.2. *alfejezetben* kifejlesztett *T-Tip-HFBA* tisztító eljárásnak, a proteomikai frakciót a 4.1. *alfejezetben* kifejlesztett *A-Tip-TFA-I* proteomikai tisztításnak vetettük alá a nanoHPLC-MS/MS mérés előtt.

3.4.2. Foszfoproteomikai nanoHPLC-MS/MS mérés

A mintákat 8 μ L *Injektálási oldószerben* (98 V/V% H₂O + 2 V/V% ACN + 0,1 V/V% FA) oldottuk fel, amelyből 6 μ L-t injektáltunk. A minták mérését nanoElute 2 nano-HPLC-vel (Bruker, Bréma, Németország) kapcsolt CaptiveSpray 1 ionforrással felszerelt Bruker Daltonics timsTOF HT tandemtömegspektrométerrel (Bruker, Bréma, Németország) végeztük.

A foszfopeptidek méréséhez egy kísérleti monolit C₁₈, 150 mm x 30 μ m, kapilláris kolonnát (Bruker, Bréma, Németország) használtunk, a trappeléshez Acclaim PepMap100 C₁₈ töltetes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 300 μ m x 5 mm Nano Trap kolonnát használtunk. Az A eluens: 0,1 V/V FA + 100 V/V% H₂O, a B eluens: 0,1 V/V% FA + 100 V/V% ACN volt. Az alkalmazott gradiens program a következő volt: 5% B $\rightarrow$ 17% B-re (7 perc alatt), 17% B $\rightarrow$ 35% B (3 perc alatt), 35% B $\rightarrow$ 95% B (5 perc alatt). A gradiensprogramhoz 500 nL/perc áramlási sebességet alkalmaztunk.

A tömegspektrometriás mérés paraméterei: m/z tartomány: 100-1700 Th; ionmobilitás tartomány: 0.84-1.3 1/K0; töltés tartomány: 0-5; transzferidő: 60 μ s; ion-polaritás: pozitív szkennelés, DDA mérési mód.

3.4.3. Foszfoptoteomikai adatelemzés

A tömegspektrumok alapján a peptidek és fehérjék azonosítását, 3.3.4. *alfejezetben* leírtak szerint végeztük annyi különbséggel, hogy a peptidek és fehérjék azonosításához az UniProt^[62] oldalon (www.uniprot.org) 2024.03.12-én elérhető validált 20434 db emberi fehérjeszekvenciát tartalmazó adatfájlt használtuk.

A kiértékelés során kiszűrtük azokat a fehérjéket, amelyek több mint 1%-os valószínűséggel (megmaradó adatokra p -érték $< 0,01$) hibásan kerülhettek azonosításra.^[61] Továbbá kiszűrtük azokat a fehérjéket, amelyek csak 1 peptid alapján kerültek azonosításra. A kiértékelés során meghatároztuk ezeknek a fehérjéknek a foszforilációs helyeinek számát. A mintákban azonosított foszforilált fehérjék hálózatelemzéséhez a STRING weboldalt használtuk.^[68]

3.4.4. Proteomikai nanoHPLC-MS/MS mérés

A mintákat 15 μ L *Injektálási oldószerben* (95 V/V% H₂O + 5 V/V% ACN + 0,1 V/V% FA) oldottuk fel, amelyből 8 μ L-t injektáltunk. A minták mérését Thermo Scientific Ultimate 3000 RSLCnano rendszerrel (Waltham, MA, USA) kapcsolt Thermo Scientific Exploris 240 Orbitrap analizátoros tömegspektrométerrel (Waltham, MA, USA) végeztük.

A folyadékkromatográfiás méréshez EASY-spray PepMap RSLC C₁₈ töltetes 2 μ m, 75 μ m $\times$ 500 mm kapilláris kolonnát (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), előtétoszlopként Acclaim PepMap100 C₁₈ töltetes 5 μ m, 100 μ m $\times$ 20 mm Nano Trap kolonnát (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk. Az A eluens: 0,1 V/V% FA + 100 V/V% H₂O, a B eluens: 0,1 V/V% FA + 100 V/V% ACN volt. A trappelést 2 percig 20 μ L/perc áramlási sebesség mellett 99% A eluenssel végeztük. Az alkalmazott gradiens program a következő volt: 13 percig 3% B áramoltatás, 3% B $\rightarrow$ 40% B-re (90 perc alatt), 40% B $\rightarrow$ 90% B (5 perc alatt), 90% B-vel mosás (5 perc). A gradiensprogramhoz 250 nL/perc áramlási sebességet használtunk.

A tömegspektrometriás mérést pozitív ionizációs módban, DIA mérési módban végeztük, 2 kV kapillárisfeszültség mellett. A DIA MS mérés paraméterei: m/z tartomány: 350-985 Th; felbontás: 60000. A DIA MS/MS mérés paraméterei: prekurzolablak m/z tartomány 10 Th; felbontás: 15000, 28% normalizált HCD ütközési energia.

3.4.5. Proteomikai adatelemzése

A tömegspektrumok alapján a peptidek és fehérjék azonosítását, a DIA-NN^[69] szoftverrel végeztük, ehhez a UniProt^[62] oldalon (www.uniprot.org) 2024.10.15-én elérhető validált 20428 db emberi fehérjeszekvenciát tartalmazó adatfájlt, használtuk. A beállításoknál megadtuk, hogy az emésztőenzim által kihagyott hasítási helyek maximális száma 1 lehet, továbbá oxidáció és acetiláció PTM lehetett a peptideken.

A DIA-NN-ből származó adatok kiértékelését az RStudio szoftverrel^[63] végeztük. Az azonosított fehérjékből először kiszűrtük azokat, melyek több, mint 1%-os valószínűséggel (megmaradó adatokra q -érték $< 0,01$) hibásan kerülhettek azonosításra.^[61] Az adatelemzés során meghatároztuk a fehérjék számát. Az összes mintában azonosított fehérjék biológiai funkcióit és fehérje csoportjait a PANTHER weboldal segítségével határoztuk meg.^[70]

4. Eredmények

Kutatásunk során komplex biológiai mintából származó kis mennyiségű peptidkeverékek (0,5-1 µg) vizsgálatára optimáltunk egy proteomikai és egy foszfoproteomikai SPE tisztítómódszert. A proteomikai módszeroptimaláláshoz kereskedelmi forgalomban elérhető HeLa sejtlizátumot, a foszfoproteomikai módszeroptimaláláshoz tüdő adenokarcinómás FFPE szövetmetszeteket használtunk. Az így kifejlesztett módszereket 2 µm vastagságú prosztatarákos szövetek proteomikai és foszfoproteomikai jellemzésére alkalmaztuk.

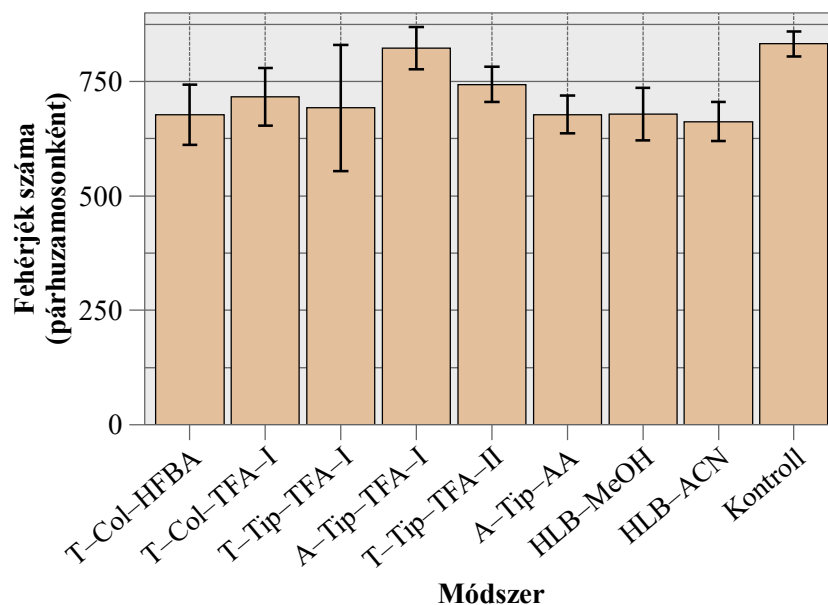
4.1. SPE módszer fejlesztése peptidek tisztítására

A peptidek tisztítására alkalmas módszer fejlesztéséhez párhuzamosonként 500 ng standard HeLa sejtvonal emésztményt használtunk. Összesen 8 különböző módszert hasonlítottunk össze, melyek vagy az alkalmazott állófázis típusában (Thermo C₁₈: T, Affinisep C₁₈: A, Affinisep HLB: HLB), vagy az oldószerrendszerben (ACN, MeOH), vagy az állófázis mennyiségében (Col, Tip) tértek el egymástól. Mindegyik módszerrel 5 párhuzamos tisztítást végeztünk, valamint kontrollként 5 párhuzamos tisztítatlan mintát alkalmaztunk. A mintákat jelölésmentes nanoHPLC-MS/MS mérésnek vetettük alá, majd az összehasonlítást az azonosított peptidek és fehérjék száma, a módszerek szelektivitása és ismételhetősége alapján végeztük.

4.1.1. Azonosított fehérjék és peptidek száma

A tisztító módszerek jellemzésére az egy mintában azonosított fehérjék és peptidek számának átlagát, valamint az 5-5 párhuzamos mérésben legalább egyszer azonosított peptidek számát alkalmaztuk.

Az egyes módszerek párhuzamosaiban azonosított fehérjék számának átlagát (4. ábra) megvizsgálva a legtöbb fehérjét az *A-Tip-TFA-I* (823 fehérje) és a *T-Tip-TFA-II* (743 fehérje) módszerekkel tudtuk azonosítani. A *Kontroll* párhuzamosaiban (832 fehérje), azért tudtunk több fehérjét azonosítani, mint bármelyik tisztító módszerben, mert a HeLa mintát gyártás során tisztítják, így nem lép fel a szennyezők miatti ionelnyomás, ami komplex biológiai mintából végzett mintaelőkészítés során fellépne.

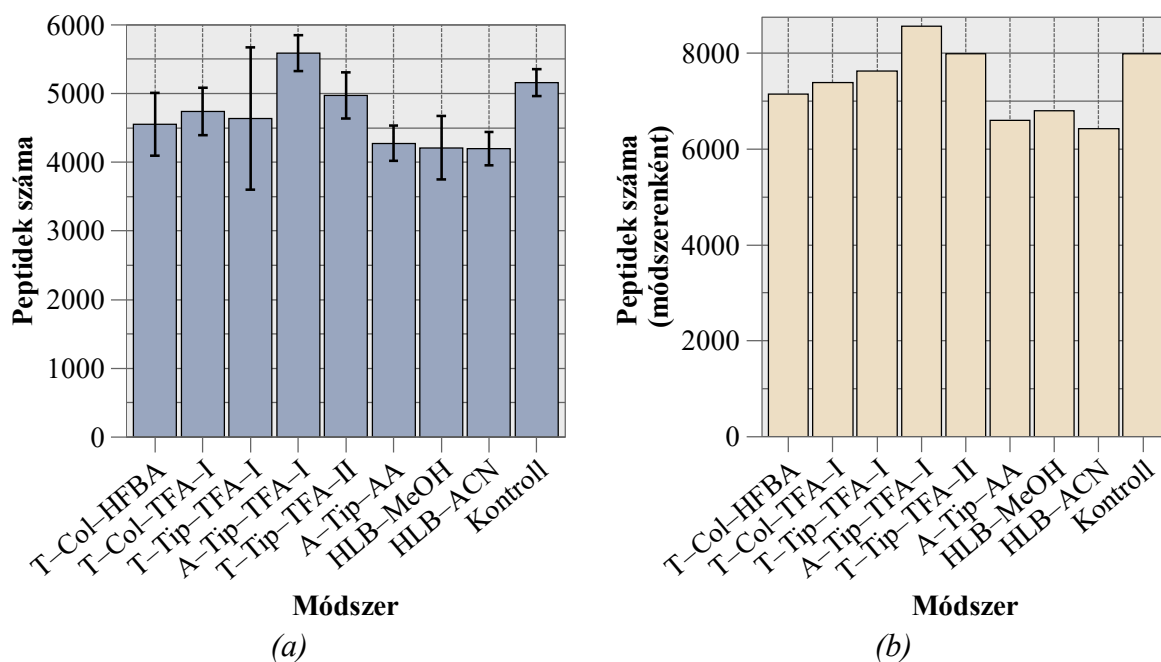


4. ábra Egyes módszerek párhuzamosaiban azonosított fehérjék száma

Az egy-egy mintában azonosított peptidek számának átlagát (5. ábra/a) és az 5-5 párhuzamos mérésben legalább egyszer azonosított peptidek számát (5. ábra/b) tekintve az *A-Tip-TFA-I* (átlag: 5586, legalább egyszer azonosított peptid: 8566) a *T-Tip-TFA-II* (átlag: 4969, legalább egyszer azonosított peptid: 7988) módszerek alkalmazásával érték el a legjobb eredményeket.

Három módszer esetén (*A-Tip-AA*, *HLB-MeOH*, *HLB-ACN*) jelentősen kevesebb peptidet (17-18%-kal) azonosítottunk, mint a tisztítatlan *Kontroll* mintában. Ennek az lehet az oka, hogy a tisztítás során a peptidek egy része nem kötődött meg az állófázison ezáltal csökkent mennyiségük, így kevesebb peptid került kiválasztásra DDA mérési módban, ezáltal kevesebb peptid került azonosításra.

Az egyes módszerek között eltérő szórás figyelhető meg az azonosított peptidek számában (5. ábra/a). Míg egyes módszerek kis szórással (*A-Tip-TFA-I*, *T-Tip-TFA-II*, *A-Tip-AA*, *HLB-ACN*), más módszerek nagyobb szórással (*T-Col-HFBA*, *T-Col-TFA-I*, *T-Tip-TFA-I*, *HLB-MeOH*) rendelkeztek. Utóbbinak oka feltételezhetőleg az, hogy a főként kis mennyiségben jelenlévő peptidek a DDA mérési módban nem minden mintában kerültek kiválasztásra.

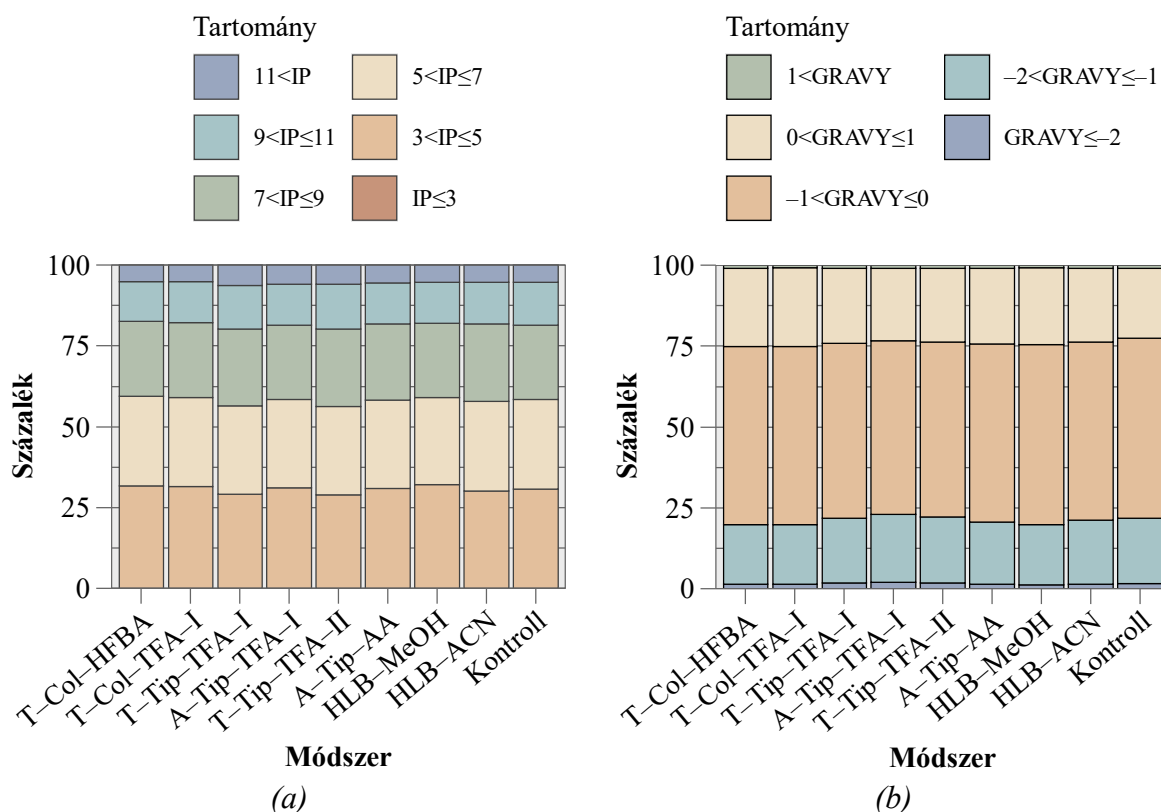


5. ábra Egyes módszerek párhuzamosaiban azonosított peptidek száma (a) és az egyes módszerekben legalább egyszer azonosított peptidek száma (b)

4.1.2. A módszerek szelektivitása

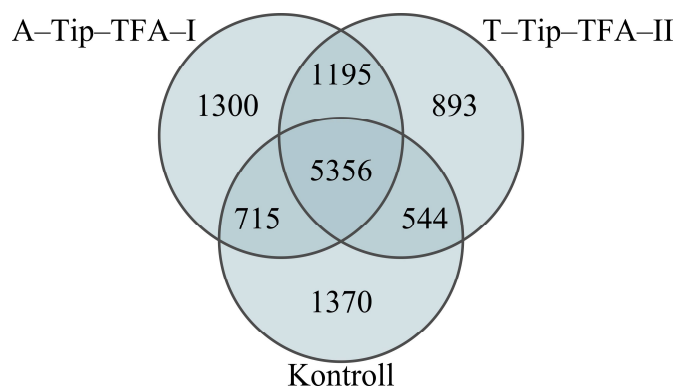
A szelektivitás az egyes peptidek hidrofíl–hidrofób jellegének számszerűsített értékének (GRAVY) és izoelektromos pontjának (IP) eloszlása alapján került megállapításra. A GRAVY érték a peptidek hidrofóbicitását, hidrofilitását számszerűsíti, a hidrofób peptidek GRAVY értéke nullánál nagyobb (minél nagyobb annál hidrofóbbabb), míg a hidrofileké nullánál kisebb (minél kisebb annál hidrofilebb).^[71] Továbbá a fehérje és peptid számok alapján a két legjobban teljesített módszerben (*A-Tip-TFA-I*, *T-Tip-TFA-II*) és a *Kontroll* mintában azonosított peptidek átfedését is összevetettük. A teljesítménymutatók megállapításához az 5-5 párhuzamosban legalább egyszer azonosított peptideket használtuk fel.

Az azonosított peptidek számított IP értékének százalékos eloszlását (6. ábra/a) összevetve megállapítható, hogy az összes módszer a *Kontroll*hoz hasonló. Az azonosított peptidek GRAVY értékének százalékos eloszlását (6. ábra/b) vizsgálva minden módszerrel a *Kontroll*hoz hasonlóan főként hidrofíl peptidek (kb. 79%), valamint kevesebb hidrofób peptid (kb. 21%) került azonosításra. Ezek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a tisztító módszerek nem mutattak jelentős szelektivitást bizonyos peptidekre azok hidrofób vagy savas tulajdonságai alapján.



6. ábra A különböző tisztító módszerek alkalmazása során a mintákban azonosított peptidek izoelektromos pontjának (a) és GRAVY értékének (b) tartomány béli százalékos eloszlása

Az eddigiek alapján a két legjobban teljesítő módszer alkalmazása során azonosított és a *Kontroll* mintában azonosított peptidek minőségét összevetve (7. ábra) megfigyelhető, hogy az *A-Tip-TFA-I* módszerrel azonosított peptidek 15,2%-a, a *T-Tip-TFA-II* módszerrel azonosított peptidek 11,2%-a, a *Kontroll* mintában azonosított peptidek 17,2%-a csak az egyik esetben került azonosításra. Az *A-Tip-TFA-I* módszerrel azonosított peptidek 70,9%-ban, a *T-Tip-TFA-II* módszerrel azonosított peptidek 73,9%-ban fednek át minőségileg a *Kontroll* minta peptidjeivel. Mindez azzal magyarázható, hogy a legalább egyszer azonosított peptidek számát tekintve az *A-Tip-TFA-I* módszer teljesített a legjobban, majd ezt követte *T-Tip-TFA-II* módszer. Azaz az egyes módszerekben azonosított peptideknek arányaiban azonos mértékű része fed át a *Kontroll* mintákban azonosított peptidekkel.



7. ábra A-Tip-TFA-I, T-Tip-TFA-II módszer és Kontroll minta peptidjeinek átfedése

Összegzés. Az egy mintában azonosított és az 5-5 párhuzamosban legalább egyszer azonosított peptidek számát, valamint a mintában azonosított fehérjék számát tekintve az A-Tip-TFA-I módszer bizonyult a legoptimálisabbnak. Ezen túlmenően a szelektivitás – a peptidek GRAVY értékének, IP értékének százalékos eloszlása alapján – egyik módszer esetében sem torzult jelentősen a Kontrollhoz képest. Az A-Tip-TFA-I módszerrel azonosított peptidek számának átlagát (5585 peptid) és a Kontrollal azonosított peptidek számának átlagát (5159 peptid) tekintve az A-Tip-TFA-I módszerrel 8,3%-kal több peptidet azonosítottunk.

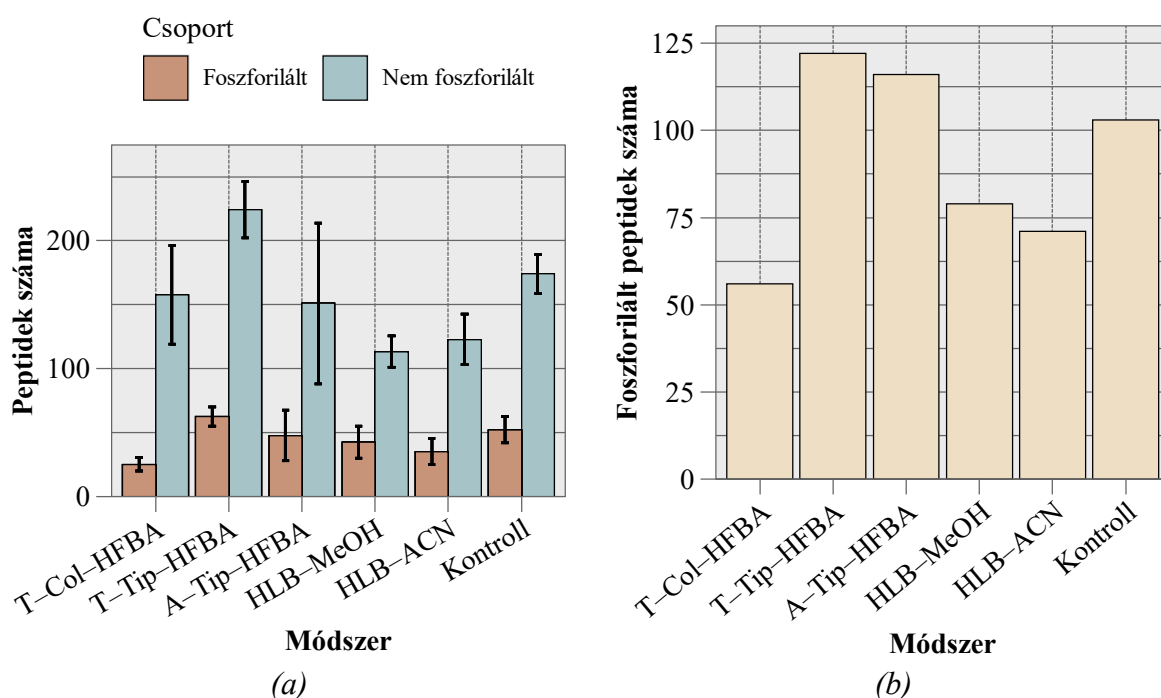
4.2. Foszfopeptid-tisztító SPE módszer fejlesztése

A foszfopeptidek tisztítására alkalmas módszer fejlesztéséhez 24 db FFPE tüdőrákos szövetmetszetet használtunk fel. A metszeteken felületi emésztést végeztünk, majd az így kapott peptidkeveréket proteomikai tisztításnak, ezt követően pedig foszfoproteomikai dúsításnak vetettük alá. Az így összeállított mintákat felhasználva a foszfopeptidekben dúsított minták sómentesítésére összesen öt különböző módszert hasonlítottunk össze, melyek vagy az alkalmazott állófázis típusában (Thermo C₁₈: T, Affinisep C₁₈: A, Affinisep HLB: HLB), vagy az oldószerrendszerben (ACN, MeOH), vagy az állófázis mennyiségében (Col, Tip) tértek el egymástól. Mindegyik módszerrel 5 párhuzamos tisztítást végeztünk, valamint kontrollként 5 tisztítatlan mintát alkalmaztunk. Ezt követően a mintákat jelölésmentes nanoHPLC-MS/MS mérésnek vetettük alá, majd az összehasonlítást az azonosított foszfopeptidek száma, a módszerek szelektivitása és az azonosítás ismételhetsége alapján végeztük.

4.2.1. Azonosított foszfopeptidek száma

A tisztító módszerek jellemzésére az egy mintában azonosított foszfopeptidek és a nem-foszforilált peptidek számát, valamint az 5-5 párhuzamos mérésben legalább egyszer azonosított foszfopeptidek számát alkalmaztuk.

A párhuzamosokban azonosított foszforilált és nem-foszforilált peptidek számának arányát összevetve (8. ábra/a) a foszforilált peptidek mennyisége a párhuzamos mintákban egy nagyságrenddel kisebb, mint a nem foszforilált peptideké, ugyanis a foszforilált peptidek kisebb mennyiségben vannak jelen a felületi emésztett mintában a nem foszforiláltakhoz képest és a dúsítás során nem specifikus kölcsönhatás révén a savas oldalláncú nem-foszforilált peptidek kis mennyisége is megkötődhet. Emellett az MS/MS mérés során a foszforilált peptidek nehezebben ionizálódnak pozitív ionizációs módban, mint a nem foszforilált peptidek, így ionelnyomás következik be és DDA módban végezve a mérést a nem foszforilált peptidek kerülnek kiválasztásra, majd később azonosításra.



8. ábra Egyes módszerek párhuzamosaiban azonosított foszforilált és nem foszforilált peptidek számának átlaga és szórása (a) és az egyes módszerekben legalább egyszer azonosított foszopeptidok száma (b)

Mind az egy-egy mintában azonosított foszopeptidok számát (8. ábra/a) tekintve, mind pedig az 5-5 párhuzamos mérésben legalább egyszer azonosított foszopeptidok számát (8. ábra/b) tekintve a *T-Tip-HFBA* (átlag: 63, legalább egyszer azonosított foszopeptid: 125) és az *A-Tip-HFBA* (átlag: 48, legalább egyszer azonosított foszopeptid: 124) módszer alkalmazásával értük el a legjobb eredményeket. Három módszer esetén (*T-Col-HFBA*, *HLB-MeOH* és *HLB-ACN*) jelentősen (19-52%-kal) kevesebb foszopeptidet azonosítottunk, mint a tisztítatlan *Kontroll* mintában. Ennek az lehet az oka, hogy a tisztítás során a foszopeptidok egy része eltávolításra került, vagy mennyiségük jelentősen csökkent, így nem kerültek sem kiválasztásra DDA mérési módban, sem pedig azonosításra a későbbiekben.

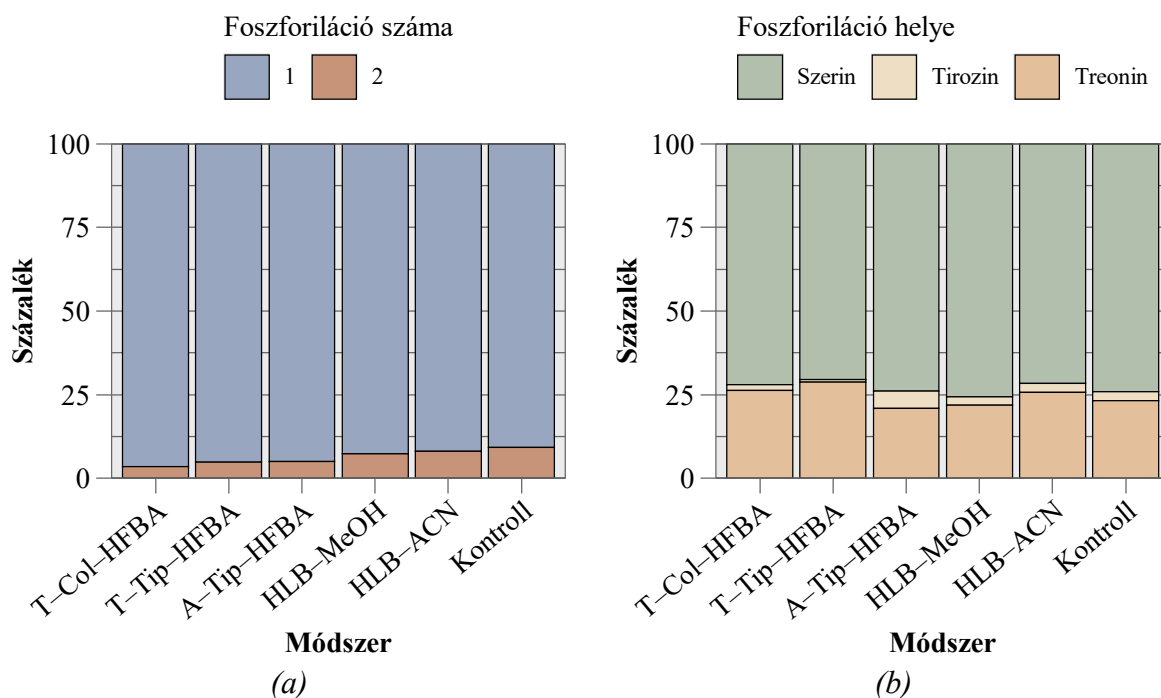
Az egyes módszerek között eltérő szórás figyelhető meg az azonosított foszfopeptidek számában (8. ábra/a). Míg egyes módszerek (*T-Col-HFBA*, *T-Tip-HFBA*, *HLB-MeOH* és *HLB-ACN*) kis szórással, más módszerek (*A-Tip-HFBA*) nagyobb szórással rendelkeztek. Utóbbinak oka feltételezhetőleg a zavaró reagensek nem teljes körű eltávolítása.

4.2.2. A módszerek szelektivitása

A szelektivitást az egyes foszforilált peptideken a foszforiláció száma, a foszforiláció helyének aránya, az egyes foszfopeptidek GRAVY és IP értékének eloszlása alapján került megállapításra.^[71] Továbbá a két legjobban teljesített módszerben (*T-Tip-HFBA*, *A-Tip-HFBA*) és a *Kontroll* mintában azonosított foszfopeptidek átfedését is összevetettük. A teljesítménymutatók megállapításához az 5-5 párhuzamosban legalább egyszer azonosított foszfopeptideket használtuk fel.

A módszerenként azonosított foszfopeptidek foszforiláció számának százalékos (9. ábra/a) és a foszforiláció helyének százalékos (9. ábra/b) eloszlásában kis eltérések figyelhetők meg. Százalékosan a legkevesebb (4,7%) kétszeresen foszforilált peptidet a *T-Col-HFBA* módszerrel azonosítottuk, míg a legtöbbet (7,3%) a *HLB-ACN* módszerrel. A *Kontroll* mintára (9,7% kétszeresen foszforilált peptid) a *HLB-MeOH* (7,1% kétszeresen foszforilált peptid) és *HLB-ACN* (7,3% kétszeresen foszforilált peptid) módszerek hasonlítanak a legjobban. Az azonosított foszfopeptidek számában jó teljesítményt mutató *T-Tip-HFBA* és *A-Tip-HFBA* módszernél közel azonos az azonosított foszfopeptidek foszforiláció számának aránya (7,7% kétszeresen foszforilált peptid).

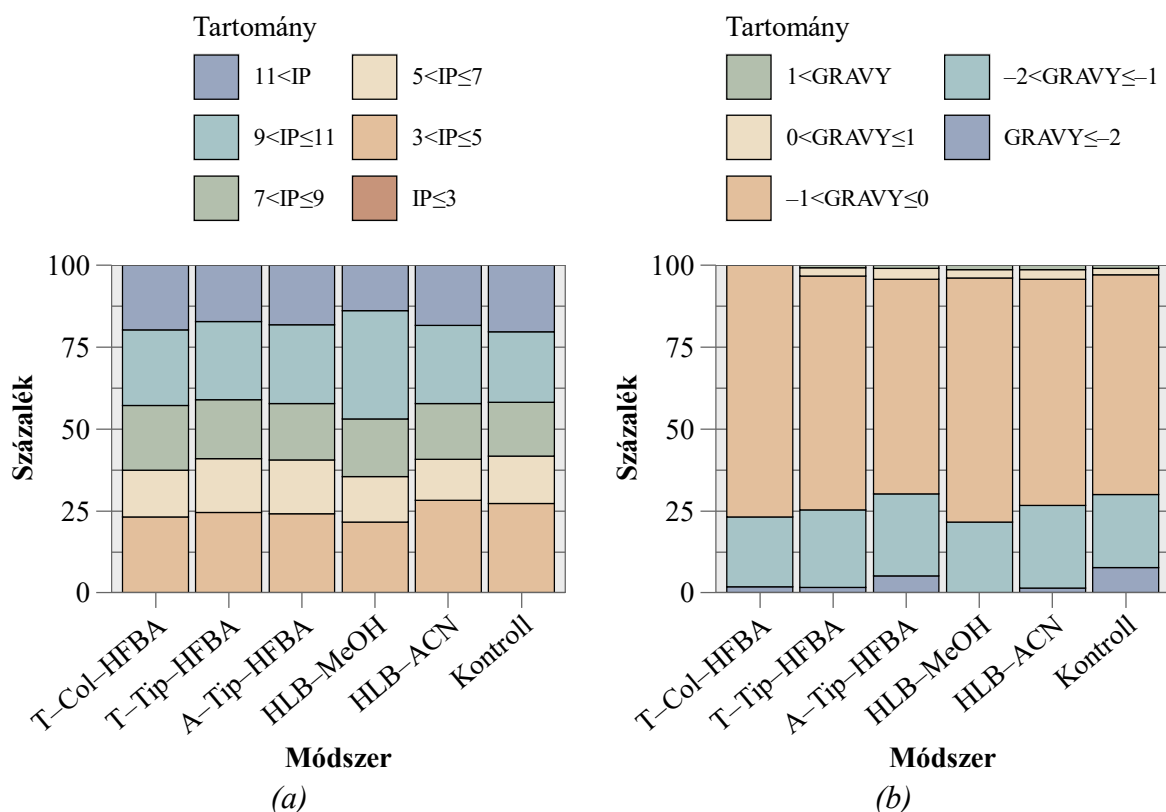
A foszfopeptidek foszforilációs helyének százalékos eloszlását vizsgálva a *T-Tip-HFBA* módszernél lecsökkent (0,78%), míg az *A-Tip-HFBA* módszernél (4,72%) megnőtt a tirozinon foszforilált peptidek aránya a *Kontrollhoz* (2,4%) képest. A szerinen foszforilált peptidek aránya (71-75%) és a treoninon foszforiláltak aránya (21-28%) a különböző módszereknél nagyjából azonos. A kisebb eltérések ellenére a módszerek között a foszforiláció helyének és a foszforiláció számának tekintetében nincs jelentős különbség.



9. ábra A különböző tisztító módszerek alkalmazása során a mintákban legalább egyszer azonosított foszfopeptidekben a foszforiláció számának (a) és helyének (b) százalékos eloszlása

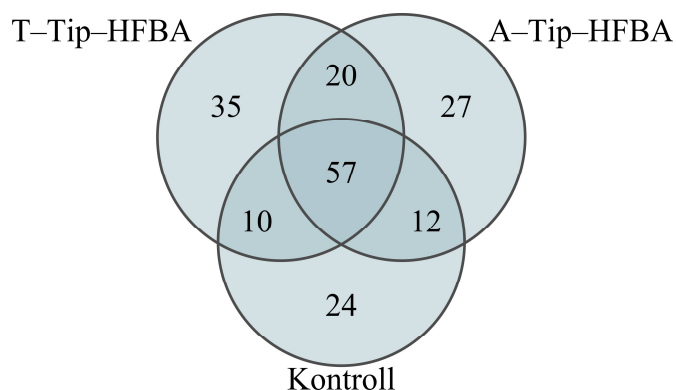
Az azonosított foszfopeptidek számított IP értékének százalékos eloszlását (10. ábra/a) összevetve a módszerek többsége a *Kontroll*hoz hasonló, ugyanakkor a *HLB-MeOH* módszernél a $9 < IP \leq 11$ tartományba eső foszfopeptidek aránya (34,6%) megnőtt a *Kontroll*hoz (22,0%) képest.

Az azonosított foszfopeptidek GRAVY értékének százalékos eloszlását (10. ábra/b) vizsgálva a legtöbb módszerrel (*T-Tip-HFBA*, *A-Tip-HFBA*, *HLB-MeOH*, *HLB-ACN*) a *Kontroll*hoz hasonlóan főként hidrofíl foszfopeptidek, valamint kevés hidrofób foszfopeptid (*Kontroll*: 2,6%, említett tisztító módszerek: 2,7-4,0%) került azonosításra, míg a *T-Col-HFBA* módszernél csak hidrofíl foszfopeptidek kerültek azonosításra. A *Kontroll*hoz képest mindegyik módszerrel kisebb arányban kerültek azonosításra $GRAVY \leq -2$ tartományba tartozó foszfopeptidek. Míg a *Kontroll*ban 7,8% a $GRAVY \leq -2$ tartományba tartozó foszfopeptidek aránya, az *A-Tip-HFBA* módszernél 5,2%, a további három módszer esetében (*T-Col-HFBA*, *T-Tip-HFBA*, *HLB-ACN*) 1,4-1,7%, a *HLB-MeOH* módszernél pedig nem kerültek azonosításra ilyen foszfopeptidek. Ugyanakkor a *T-Col-HFBA* módszer kivételével mindegyik módszerrel ugyanolyan arányban kerültek azonosításra hidrofíl, hidrofób peptideket, mint a *Kontroll*ban, ezért a hidrofobicitás tekintetében a *T-Col-HFBA* módszer kivételével nincs jelentős eltérés a módszerek között.



10. ábra A különböző tisztító módszerek alkalmazása során a mintákban azonosított foszfopeptidek izoelektromos pontjának (a) és GRAVY értékének (b) tartomány béli százalékos eloszlása

Összevetve a két legjobban teljesítő módszerben (*T-Tip-HFBA*, *A-Tip-HFBA*) és a *Kontrollban* azonosított foszforilált peptidek minőségét (11. ábra), megfigyelhető, hogy a két tisztító módszer alkalmazása esetén, valamint a *Kontroll* mintában együttesen azonosított foszfopeptidek nagyjából 20%-a csak az egyik esetben került azonosításra. Az *A-Tip-HFBA* foszfopeptidjeinek 64,5%-a, a *T-Tip-HFBA* foszfopeptidjeinek a 60%-a fed át minőségileg a *Kontroll* foszfopeptidjeivel. Bár kisebb eltérés tapasztalható az átfedésben, a két módszer nem befolyásolja jelentősen a tisztító módszerekben és a *Kontroll* mintában azonosított peptidek minőségi átfedését.



11. ábra *T-Tip-HFBA és A-Tip-HFBA módszer és Kontroll minta foszfopeptidjeinek átfedése*

Összegzés. Az egy mintában azonosított és az 5-5 párhuzamosban legalább egyszer azonosított foszfopeptidok számát tekintve a *T-Tip-HFBA* módszer bizonyult a legoptimálisabbnak. Ezen túlmenően a szelektivitás – a foszfopeptidok foszforiláció számának, foszforiláció helyének, GRAVY értékének, IP értékének százalékos eloszlása alapján – egyik módszer esetében sem torzult jelentősen a *Kontroll*hoz képest. A *T-Tip-HFBA* módszerrel azonosított foszfopeptidok számának átlagát (63 foszfopeptid) és a *Kontrollal* azonosított foszfopeptidok számának átlagát (52 foszfopeptid) tekintve az *T-Tip-HFBA* módszerrel 21,2%-kal több foszfopeptidet azonosítottunk.

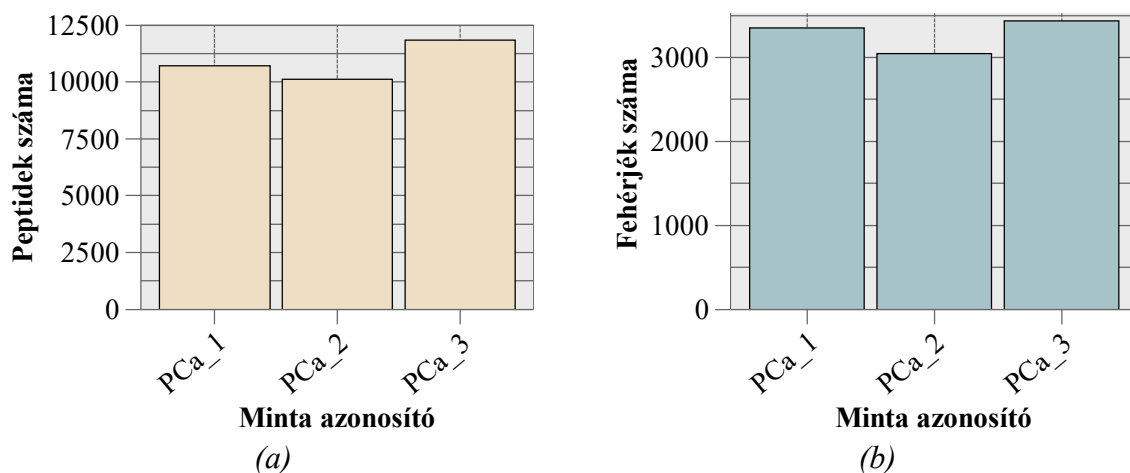
4.3. Prosztata szövetszövetek vizsgálata

A kutatás további részében a két kifejlesztett tisztítómódszer felhasználásával végeztünk három 2 μm vastagságú prosztatatametszet vizsgálatát egy előkísérlet során. Célunk egy nagyobb kohort (közel 100 minta) vizsgálata, melyhez ezen előkísérletek elengedhetetlenek. A fehérjéket triptikusán elemésztettük a szövetek felületén, és az így kapott peptidkeveréket a kifejlesztett *A-Tip-TFA-I* módszerrel tisztítottuk. A tisztított peptidkeveréken TiO_2 -alapú foszfopeptid dúsítást végeztünk, így a mintákat egy foszfoproteomikai (foszfopeptidekben dús) és egy proteomikai frakcióra szeparáltuk. A nanoHPLC-MS/MS mérés előtt a proteomikai frakciókat az *A-Tip-TFA-I* módszerrel tisztítottuk, a foszfoproteomikai frakciókat pedig a kifejlesztett *T-Tip-HFBA* módszerrel.

4.3.1. Prosztata metszetek (foszfo)proteomikai vizsgálatának eredményei

Proteomika. Az azonosított fehérjék számát összevetve (12. ábra) látható, hogy a 3 minta mindegyikében több, mint 10 000 különböző peptidet és több, mint 3000 egyedi fehérjét tudtunk azonosítani. A prosztatatametszet vizsgálatához használt tömegspektrométer érzékenyebb

mint, amit a módszerfejlesztéseknél használtunk, ezért tudunk több peptidet és fehérjét azonosítani.

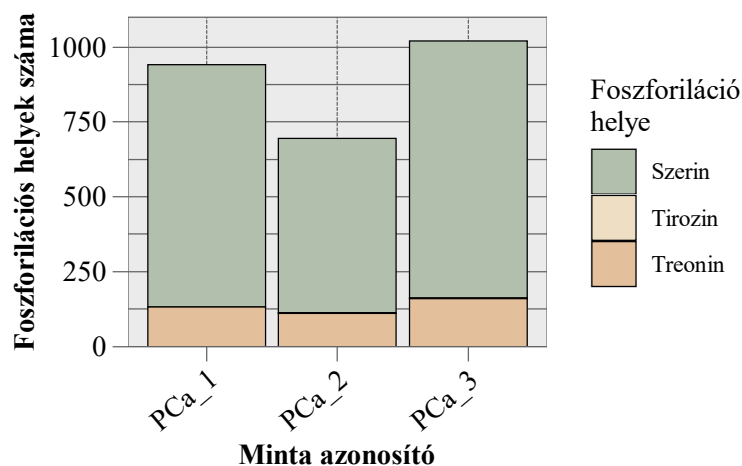


12. ábra Minták proteomika frakciójában azonosított peptidek (a) és fehérjék (b) száma

A mindhárom mintában azonosított 2544 fehérje biológiai funkcióját megvizsgálva a fehérjékhez rendelt fő folyamatok az alábbiak: a sejtfolyamatok (összes biológiai folyamat 36,7%-a), metabolikus folyamatok (összes biológiai folyamat 21,3%-a), metabolikus szabályozó folyamatok (összes biológiai folyamat 16,0%-a), lokalizáció (összes biológiai folyamat 8,3%-a) és az ingerekre adott válaszfolyamatok (összes biológiai folyamat 7,3%-a) voltak. Ezek közül korábban a metabolikus folyamatok és a sejtfolyamatok csoportjába tartozó folyamatok alul/felülműködését kapcsolatba hozták prosztatatarákkal.^[45]

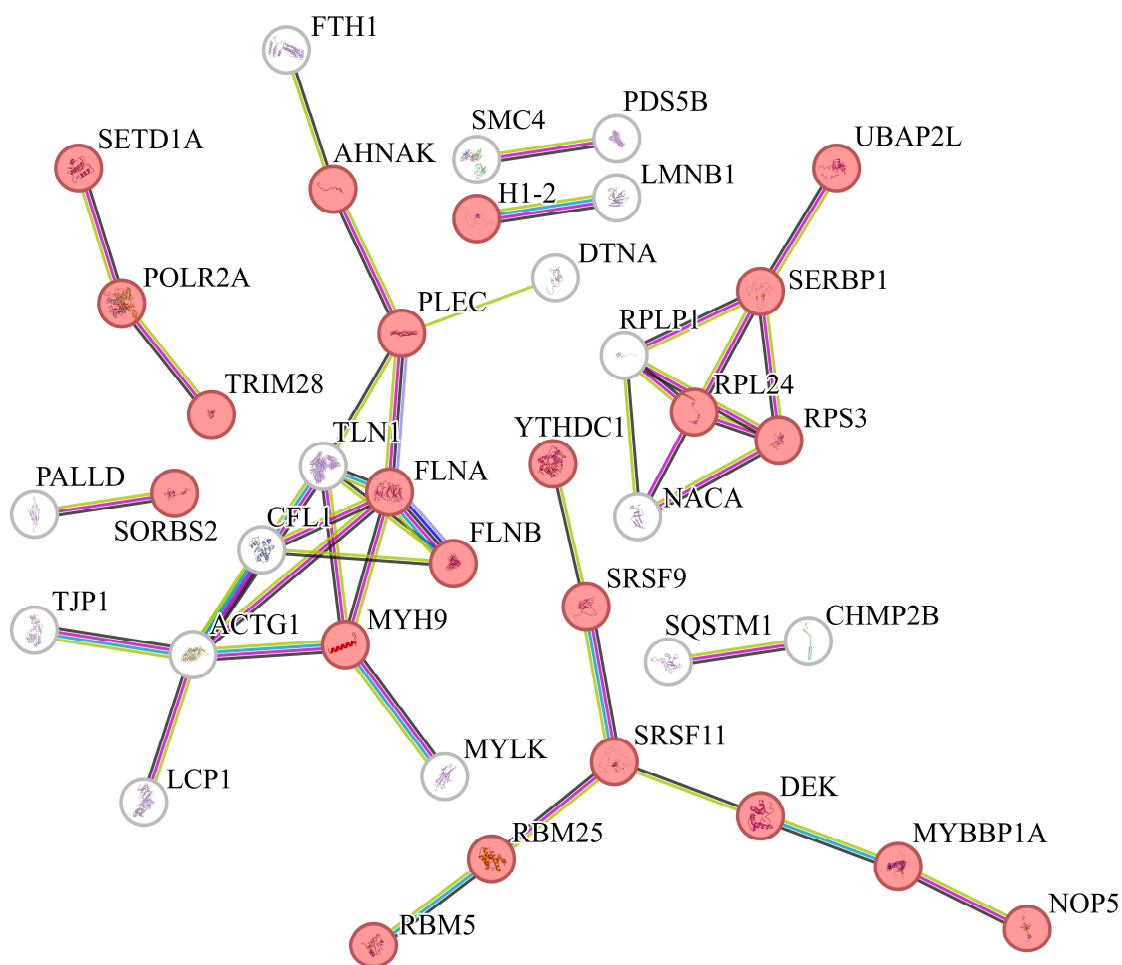
A fehérjék fehérjecsoportba való besorolását vizsgálva a PANTHER adatbázis alapján a legtöbb fehérjét tartalmazó fehérjecsoportok a következők: metabolit interkonverziós enzimek (összes fehérje 17,4%-a), RNS metabolizáló fehérjék (összes fehérje 12,4%-a), fehérje módosító fehérjék (összes fehérje 10,8%-a), citoszkeletális fehérjék (összes fehérje 10,6%-a), és a transzlációs fehérjék (összes fehérje 8,9%-a). Ezek közül az RNS metabolizáló fehérjék és a transzlációs fehérjék csoportjába tartozó fehérjék alul/felülexpresszációja már ismert prosztatatarák esetén.^[45]

Foszfoproteomika. A foszfoproteomikai frakcióban azonosított foszforilációs helyek számát (13. ábra) megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy túlnyomó részt szerin foszforilációs helyek és kevés treonin foszforilált hely került azonosításra. Ennek oka, hogy a szerin foszforilációja a leggyakoribb.



13. ábra Minták foszfoproteomika frakciójában azonosított foszforilációs helyek száma

A három mintában összesen 509 foszforilált fehérjét azonosítottunk. Ezen fehérjéken fehérje-fehérje hálózatelemzést végeztünk STRING-ben (14. ábra). Azok az azonosított foszforilált fehérjék közül azok, melyek között nagy statisztikai bizonyossággal van kapcsolat, többségének az RNS kötésben van szerepük.



14. ábra Foszforilált fehérjék hálózatelemzése. A körök mutatják a fehérjéket, melyek közül a pirossal színezettek az RNS kötésben szerepet játszó fehérjék, a közöttük lévő élek pedig a köztük lévő kapcsolatot mutatják

Összegzés. A proteomika frakcióban azonosított peptidek és fehérjék száma, valamint a foszfoproteomika frakcióban azonosított foszforilációs helyek száma is azt bizonyítja, hogy a fejlesztett SPE tisztítómódszerek jól alkalmazhatóak szövetmetszetek proteomikai és foszfoproteomikai vizsgálata esetén. A prosztatametszetek vizsgálata alapján több, általunk is azonosított biológiai folyamatról korábban már kimutatták, hogy megváltozik a prosztatatumoros sejtekben.

5. Összefoglalás

A szakirodalomban számos SPE eljárás található, ugyanakkor általánosságban ezek nem optimáltak kis mennyiségű komplex biológiai minták tisztítására. Emiatt célul tűztük ki a tömegspektrometriás mérést megelőzően a kis mennyiségű (0,5-1 µg) biológiai minták peptidjeinek és foszfopeptidjeinek tisztítására alkalmas SPE módszerek optimalását. A proteomikai módszerfejlesztés során 4 eltérő állófázis és 6 oldószerrendszer kombinálásával 8 különböző módszer alkalmazhatóságát, a foszfoproteomikai módszerfejlesztés során pedig 4 állófázis és 3 oldószerrendszer kombinálásával 5 különböző módszer alkalmazhatóságát vizsgáltuk.

A tisztító módszerek összehasonlításánál a hatékonyság, valamint a szelektivitás voltak az elemzési szempontok. A módszerfejlesztés során a hatékonyság a párhuzamosokban azonosított fehérjék, peptidek és foszfopeptidek számának átlaga, valamint a legalább egy mintában azonosított peptidek, valamint foszfopeptidek száma alapján került megállapításra. A szelektivitás összehasonlítását a módszerekkel azonosított peptidek, foszfopeptidek hidrofóbicitása és savassága alapján végeztük, továbbá a foszfoproteomikai vizsgálatokban a foszforiláció számának és foszforiláció helyének eloszlása alapján állapítottuk meg.

A 8 proteomikai tisztítómódszer közül a párhuzamosokban azonosított peptidek számának átlaga alapján (8,3%-os növekedés a tisztítatlan kontroll mintához képest) az *A-Tip-TFA-I* módszer bizonyult a leghatékonyabbnak 500 ng HeLa emésztmény analízise során. Az 5 foszfoproteomikai tisztítómódszer közül a párhuzamosokban azonosított foszfopeptidek számának átlaga (21,2%-os növekedés a tisztítatlan kontroll mintához képest) alapján a *T-Tip-HFBA* módszerrel értük el a legjobb hatékonyságot FFPE tumoros tüdőmetszetek analízise során. Sem a foszfoproteomikai, sem a proteomikai tisztítómódszerek esetén nem tapasztaltunk jelentős különbséget a módszerek szelektivitásában.

A fejlesztett foszfopeptidek és peptidek tisztítására alkalmas SPE tisztítómódszereket sikeresen alkalmaztuk prosztata szövetminták elemzésére, ezáltal vizsgálataink alapját képezik egy, a prosztatarák foszfoproteomikai hátterét feltáró, nagy elemszámú kutatásnak.

Irodalomjegyzék

1. G. Daniels, Z. Pei, S. K. Logan and P. Lee, Mini-review: androgen receptor phosphorylation in prostate cancer. *American journal of clinical and experimental urology*, 2013, **1** (1), 25.
2. Q. Zhong, X. Xiao, Y. Qiu, et al., Protein posttranslational modifications in health and diseases: Functions, regulatory mechanisms, and therapeutic implications. *MedComm*, 2023, **4** (3), e261.
3. W. Yang, M. R. Freeman and N. Kyprianou, Personalization of prostate cancer therapy through phosphoproteomics. *Nature Reviews Urology*, 2018, **15** (8), 483-497.
4. F. Bugyi, G. Tóth, K. B. Kovács, et al., Comparison of solid-phase extraction methods for efficient purification of phosphopeptides with low sample amounts. *Journal of Chromatography A*, 2022, **1685** 463597.
5. J. Bobalova, D. Strouhalova and P. Bobal, Common Post-translational Modifications (PTMs) of Proteins: Analysis by Up-to-Date Analytical Techniques with an Emphasis on Barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, **71** (41), 14825-14837.
6. S. Ramazi and J. Zahiri, Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database*, 2021, **2021** baab012.
7. M. D. Hoffman, M. J. Sniatynski and J. Kast, Current approaches for global post-translational modification discovery and mass spectrometric analysis. *Analytica chimica acta*, 2008, **627** (1), 50-61.
8. E. R. Stadtman, Protein oxidation and aging. *Free radical research*, 2006, **40** (12), 1250-1258.
9. proteome. *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, 2019,
10. D. C. Liebler, Introduction to proteomics: tools for the new biology. *Springer Science & Business Media*, 2001,
11. I. A. Brewis and P. Brennan, Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 2010, **80** 1-44.
12. É. Csősz, Z. Darula, L. Drahos, et al., Bevezetés a proteomikába: a fehérjék korszerű vizsgálata. *Semmelweis Kiadó*, 2023, Budapest.
13. I. Dunham, A. Hunt, J. Collins, et al., The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature*, 1999, **402** (6761), 489-495.

14. P. R. Graves and T. A. Haystead, Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2002, **66** (1), 39-63.
15. R. Xu, C. Gong, C. Duan, et al., Age-dependent changes in the plasma proteome of healthy adults. *The journal of nutrition, health & aging*, 2020, **24** 846-856.
16. F. Lottspeich, Introduction to proteomics. *Proteomics: Methods and Protocols*, 2009, 3-10.
17. B. R. Reschke and A. T. Timperman, A study of electrospray ionization emitters with differing geometries with respect to flow rate and electrospray voltage. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 2011, **22** (12), 2115-2124.
18. W. C. Cho, Proteomics technologies and challenges. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 2007, **5** (2), 77-85.
19. R. Matthiesen and J. Bunkenborg, Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics, Introduction to Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Humana Press*, 2013, Totowa, NJ, 1-45.
20. S. R. Shuken, An introduction to mass spectrometry-based proteomics. *Journal of Proteome Research*, 2023, **22** (7), 2151-2171.
21. L. Switzar, M. Giera and W. M. Niessen, Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *Journal of proteome research*, 2013, **12** (3), 1067-1077.
22. P. B. Pandeswari and V. Sabareesh, Middle-down approach: a choice to sequence and characterize proteins/proteomes by mass spectrometry. *RSC advances*, 2019, **9** (1), 313-344.
23. A. D. Catherman, O. S. Skinner and N. L. Kelleher, Top down proteomics: facts and perspectives. *Biochemical and biophysical research communications*, 2014, **445** (4), 683-693.
24. J. W. Wong and G. Cagney, An overview of label-free quantitation methods in proteomics by mass spectrometry. *Proteome bioinformatics*, 2010, 273-283.
25. C. Lindemann, N. Thomanek, F. Hundt, et al., Strategies in relative and absolute quantitative mass spectrometry based proteomics. *Biological chemistry*, 2017, **398** (5-6), 687-699.
26. A. Żwir-Ferenc and M. Biziuk, Solid Phase Extraction Technique--Trends, Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2006, **15** (5),

27. A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri and V. Cerdà, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, **80** 655-667.
28. A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri and V. Cerdà, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, **80** 641-654.
29. M. R. Bladergroen and Y. E. Van Der Burgt, Solid-Phase Extraction Strategies to Surmount Body Fluid Sample Complexity in High-Throughput Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2015, **2015** (1), 250131.
30. F. Bugyi, L. Turiák, L. Drahos and G. Tóth, Optimization of reversed-phase solid-phase extraction for shotgun proteomics analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 2023, **58** (8), e4965.
31. M. Shibue, C. Mant and R. Hodges, Effect of anionic ion-pairing reagent hydrophobicity on selectivity of peptide separations by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 2005, **1080** (1), 68-75.
32. M. E. Badawy, M. A. El-Nouby, P. K. Kimani, et al., A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis. *Analytical Sciences*, 2022, **38** (12), 1457-1487.
33. C. Schmelter, S. Funke, J. Treml, et al., Comparison of two solid-phase extraction (SPE) methods for the identification and quantification of porcine retinal protein markers by LC-MS/MS. *International journal of molecular sciences*, 2018, **19** (12), 3847.
34. O. Kelemen, I. Pla, A. Sanchez, et al., Proteomic analysis enables distinction of early-versus advanced-stage lung adenocarcinomas. *Clinical and Translational Medicine*, 2020, **10** (2), e106.
35. N. Jehmlich, C. Golatowski, A. Murr, et al., Comparative evaluation of peptide desalting methods for salivary proteome analysis. *Clinica Chimica Acta*, 2014, **434** 16-20.
36. X. Guo and B. S. Kristal, The use of underloaded C18 solid-phase extraction plates increases reproducibility of analysis of tryptic peptides from unfractionated human plasma. *Analytical biochemistry*, 2012, **426** (1), 86-90.
37. T. Bilbrough, E. Piemontese and O. Seitz, Dissecting the role of protein phosphorylation: a chemical biology toolbox. *Chemical Society Reviews*, 2022, **51** (13), 5691-5730.
38. T. Y. Low, M. A. Mohtar, P. Y. Lee, et al., Widening the bottleneck of phosphoproteomics: evolving strategies for phosphopeptide enrichment. *Mass spectrometry reviews*, 2021, **40** (4), 309-333.

39. A. Leitner, Enrichment strategies in phosphoproteomics. *Phospho-Proteomics: Methods and Protocols*, 2016, 105-121.
40. J. Fila and D. Honys, Enrichment techniques employed in phosphoproteomics. *Amino Acids*, 2012, **43** (3), 1025-1047.
41. K. Ogata and Y. Ishihama, CoolTip: low-temperature solid-phase extraction microcolumn for capturing hydrophilic peptides and phosphopeptides. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2021, **20**
42. R. Chen, S. Williamson, K. M. Fulton, et al., Simultaneous analysis of phosphopeptides and intact glycopeptides from secretome with mode switchable solid phase extraction. *Analytical Methods*, 2019, **11** (41), 5243-5249.
43. Saloni Dattani, Fiona Spooner, Hannah Ritchie and M. Roser, Causes of Death. 2023. Elérhető: <https://ourworldindata.org/causes-of-death> [hozzáférés: 2023.08.20.].
44. I. A. f. R. o. Cancer, Absolute cancer incidence numbers between males. 2022. Elérhető: <https://gco.iarc.who.int> [hozzáférés: 2024.08.20.].
45. S. Sugár, G. Tóth, F. Bugyi, et al., Alterations in protein expression and site-specific N-glycosylation of prostate cancer tissues. *Scientific reports*, 2021, **11** (1), 15886.
46. F. A. Baig, A. Hamid, T. Mirza and S. Syed, Ductal and acinar adenocarcinoma of prostate: morphological and immunohistochemical characterization. *Oman medical journal*, 2015, **30** (3), 162.
47. A. Atan and Ö. Güzel, How should prostate specific antigen be interpreted? *Turkish journal of urology*, 2013, **39** (3), 188.
48. K. Davaliev and M. Polenakovic, Proteomics in Diagnosis of Prostate Cancer/Протеомика Во Дијагноза На Простатниот Карцином. *Prilozi*, 2015, **36** (1), 5-36.
49. A. Nepal, P. Sharma, S. Bhattarai, et al., Extremely Elevated Prostate-Specific Antigen in Acute Prostatitis: A Case Report. *Cureus*, 2023, **15** (8),
50. A. Latosinska, M. Frantzi, A. S. Merseburger and H. Mischak, Promise and Implementation of Proteomic Prostate Cancer Biomarkers. *Diagnostics*, 2018, **8** (3), 57, DOI: 10.3390/diagnostics8030057.
51. C. P. Tanase, E. Codrici, I. D. Popescu, et al., Prostate cancer proteomics: Current trends and future perspectives for biomarker discovery. *Oncotarget*, 2017, **8** (11), 18497–18512.
52. N. Sadeesh, M. Scaravilli and L. Latonen, Proteomic landscape of prostate cancer: The view provided by quantitative proteomics, integrative analyses, and protein interactomes. *Cancers*, 2021, **13** (19), 4829.

53. D. D. Wiredja, M. Ayati, S. Mazhar, et al., Phosphoproteomics Profiling of Nonsmall Cell Lung Cancer Cells Treated with a Novel Phosphatase Activator. *Proteomics*, 2017, **17** (22), 1700214.
54. J. M. Drake, E. O. Paull, N. A. Graham, et al., Phosphoproteome Integration Reveals Patient-Specific Networks in Prostate Cancer. *Cell*, 2016, **166** (4), 1041-1054.
55. R. B. Kitata, W.-K. Choong, C.-F. Tsai, et al., A data-independent acquisition-based global phosphoproteomics system enables deep profiling. *Nat. Commun.*, 2021, **12** (1), 2539.
56. M. Katsogiannou, J. B. Boyer, A. A.-O. Valdeolivas, et al., Integrative proteomic and phosphoproteomic profiling of prostate cell lines. *PLoS One*, 2019, **14** (11), e0224148.
57. J. R. Ramroop, M. N. Stein and J. M. Drake, Impact of Phosphoproteomics in the Era of Precision Medicine for Prostate Cancer. *Front. Oncol.*, 2018, **8** 28.
58. R. Xu, Y. Chen, Z. Wang, et al., Phosphoproteomics Identifies Significant Biomarkers Associated with the Proliferation and Metastasis of Prostate Cancer. *Toxins*, 2021, **13** (8), 554, DOI: 10.3390/toxins13080554.
59. H. Ishiguro, K. Akimoto, Y. Nagashima, et al., aPKC λ promotes growth of prostate cancer cells in an autocrine manner through transcriptional activation of interleukin-6. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2009, **106** (38), 16369-16374.
60. A. P. Fields and R. P. Regala, Protein kinase C α : Human oncogene, prognostic marker and therapeutic target. *Pharmacol. Res.*, 2007, **55** (6), 487-497.
61. M. Bern, Y. J. Kil and C. Becker, Byonic: advanced peptide and protein identification software. *Current protocols in bioinformatics*, 2012, **40** (1), 13.20. 1-13.20. 14.
62. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic acids research*, 2021, **49** (D1), D480-D489.
63. P. Team, RStudio: Integrated Development Environment for R. 2023. Elérhető: <http://www.posit.co/> [hozzáférés: 2024.09.02.].
64. D. C. a. J. R. Lobry, Structural approaches to sequence evolution: Molecules, networks, populations. *Springer-Verlag*, 2007, New York.
65. S. Fuchs, GRAVY CALCULATOR. Elérhető: www.gravy-calculator.de [hozzáférés: 2024.08.24.].
66. H. Wickham, ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. *Springer-Verlag* 2016, New York.
67. H. Chen, *VennDiagram: Generate High-Resolution Venn and Euler Plots*, in *R package version 1.7.3*. 2022.

68. D. Szklarczyk, A. L. Gable, D. Lyon, et al., STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*, 2019, **47** (D1), D607-D613.
69. V. Demichev, C. B. Messner, S. I. Vernardis, et al., DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. *Nature methods*, 2020, **17** (1), 41-44.
70. P. D. Thomas, D. Ebert, A. Muruganujan, et al., PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Science*, 2022, **31** (1), 8-22.
71. K. Y. Chang and J. R. Yang, Analysis and prediction of highly effective antiviral peptides based on random forests. *PLoS One*, 2013, **8** (8), e70166.