

Biológia TDK 2014 őszi forduló

**SZÉRUM FEHÉRJÉKEN ELŐFORDULÓ
POSZTTRANSLÁCIÓS MÓDOSÍTÁSOK DÚSÍTÁSA
FÉM-AFFINITÁS KROMATOGRÁFIÁS
ELJÁRÁSOKKAL**

Rafai Timea-Biológus, MSc 2.évfolyam Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar, Szegedi Biológiai
Kutatóközpont

Témavezető-Dr Klement Éva

Proteomikai Laboratórium

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETŐ ÉS CÉLKITŰZÉS.....	3
ANYAG ÉS MÓDSZEREK.....	5
MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE.....	5
MARHA SZÉRUM (FBS) ÉS HUMÁN SZÉRUM (HS) EMÉSZTÉSE FASP (Filter Aided Sample Preparation)METÓDUSSEL.....	5
ESZKÖZÖK.. ..	6
IMAC-gyanta ELŐKÉSZÍTÉSE.....	6
SZÉRUM EMÉSZTMÉNYEK DÚSÍTÁSA... ..	6
TÖMEGSPEKTROMETRIAI ANALÍZIS ÉS ADATOK KIÉRTÉKELÉSE.....	6
EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS	7
ÖSSZEGZÉS.....	13
IRODALOMJEGYZÉK	13
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	15
TÉTELES SZAKMAI HOZZÁJÁRULÁS	16

BEVEZETŐ ÉS CÉLKITÚZÁS

A fehérjéknek több száz reverzibilis és irreverzibilis poszttranszlációs módosítása ismeretes (1). A különböző módosítások szerepe változó, hatást gyakorolhatnak a fehérjék szerkezetére, stabilitására, a sejten belüli illetve kívüli lokalizációjukra, a működésükre, egymás közötti kölcsönhatásaik kialakulására. A módosítások között kiemelkedő jelentőséggel bír a glikoziláció és a foszforiláció. A fehérjék glikozilációja az egyik leggyakoribb módosítás, a fehérjék mintegy fele glikozilálódik az élettartama alatt (2). A sejten belüli fehérjéknél a szignálutak szabályozásában vesz részt, míg a sejten kívüli és a membránban elhelyezkedő fehérjék esetén fontos szerepet játszik a sejtadhéziós folyamatokban, a sejt-sejt és sejt-ligand interakciók kialakításában, ezen felül a glikán csoport stabilizálja a fehérje konformációját és proteolitikus rezisztenciát biztosít számára (3). A szénhidrát módosítás meghatározott aminosav oldalancok O-, N- vagy C-atomjához kapcsolódhat. Az N-glikoziláció az oligoszaharidoknak az aszpargin oldalláncának amid csoportján lévő nitrogénhez történő kapcsolódása, az O-glikoziláció a szerin, treonin és/vagy hidroxiprolin hidroxil csoportjához, a C-glikoziláció a triptofán indolgyűrűjének C2-es szénatomjához való kapcsolódást jelenti. A membránhoz kötött és szekretált proteinek enzimatis glikozilációja az endoplazmatikus retikulumban kezdődik, majd a Golgi-készülékben alakul ki végleges szerkezetük, itt szortírozódnak és jutnak el végleges helyükre. Analitikai szempontból a C-glikozilált fehérjék azonosítása a legegyszerűbb azon okból kifolyólag, hogy ismeretes konszenzus szekvenciájuk (W-X-X-W, az első triptofán módosul), amely nem vész el a minta előkészítés és a tömegspektrometriás analízis alkalmával. Az N-glikoziláció konszenzus szekvenciája N-X-S/T/C (a középső aminosav nem lehet prolin), jellemző rá egy univerzális magstruktúra, amelyhez változatos szénhidrátláncok kapcsolódhatnak, továbbá azonosították specifikus endoglikozidázát (peptid N-glikozidáz F), amely úgy hasítja a szénhidrát struktúrát, hogy az aszpargin aszparginsavvá hidrolizálja, diagnosztikus jelet hagyva maga után (+1 Da tömegeltolódás a módosítatlan peptidhez képest). Az O-glikozilált fehérjék analízise sokkal körülményesebb, mivel nincs definiált konszenzus szekvenciája a módosításnak, és a kapcsolódó oligoszaharid is nagy változatosságot mutat. Továbbá nincs univerzális endoglikozidáza, és nincs meghatározott kémiai módszer sem, amely specifikusan hidrolizálná úgy, hogy az a módosítás helyének meghatározásához hasznos diagnosztikus jelet biztosítana.

A másik igen elterjedt módosítás a fehérjék foszforilációja. Becslések alapján egy adott emlős sejtben a fehérjék több mint 30%-a foszforilálódik az életük során. A foszforiláció a sejtben belüli folyamatok (szignáltranszdukció, molekuláris felismerés és interakció) egyik fő szabályozó mechanizmusának eszköze, befolyásolja a sejtciklust, sejtnövekedést, metabolizmust, differenciációt, ugyanakkor szekretált fehérjéken is előfordul, bár sejtben kívüli szerepe kevésbé ismert. A foszforiláció pontos szerepének megértéséhez elkerülhetetlen, hogy meghatározzuk, mely aminosavat érinti a módosítás, a fehérje mely részén. Ezután a módosuló aminosav elmutálásával a fehérjén bekövetkező funkció vesztéséből következtetni lehet a fehérje aktivitásában, intracelluláris lokalizációjában, vagy más fehérjékkel történő interakciójában betöltött szerepére. Továbbá a foszforilációs hely meghatározásával azonosítható a fehérje kináz, amely szabályozza a fehérjét, ezáltal érthetővé válhat a biológiai funkciója és fontossága a szignáltranszdukciós folyamatokban. A fehérjék szerin, treonin és tirozin oldalláncaikon foszforilálódhatnak. A módosítás helyének tömegspektrometriás meghatározását az teszi lehetővé, hogy a módosított peptidek tömege, valamint a peptidek ütközéses aktiválása során képződő, a módosítást hordozó fragmensek tömege +80 Da-nal eltolódik. Szerinen, treoninon foszforilált peptidek fragmentációjára jellemző továbbá, hogy a foszfátcsoport lehasadhat a peptidről, aminek következtében a módosított fragmens tömegéhez képest -98 Da-nal további jelet detektálhatunk.

Az emlős szérum gazdag szekretált glikoproteinekre nézve. A rendszer különböző aberrációi, mint amilyen a glikozil transzferázok expressziójában vagy aktivitásában történő változások, vagy más faktorok amelyek hatással vannak a glikán bioszintézisre összefüggést mutatnak bizonyos krónikus betegségekkel (4, 5). Hasonlóképpen a szérumban jelenlévő fehérjék foszforiláltsági állapotában bekövetkező változások kóros állapotok biomarkereit reprezentálhatják. Így ezen módosítások feltérképezése és mennyiségi változásának meghatározása kiemelt jelentőségű. Mivel a szérum meglehetősen komplex, mindamellett a fehérjék egy igen széles dinamikus tartományt fednek le, ezért a gyakran szub-sztöchiometrikus módosítások tömegspektrometriai vizsgálatához a módosított komponensek feldúsítása szükséges. Foszforilált peptidek dúsítására leggyakrabban immobilizált fém-affinitás kromatográfiát (IMAC) (1) titán-dioxidon (1, 6) történő dúsítást vagy anioncserélő oszlopon végzett hidrofíli kromatográfiát (ERLIC) (8) alkalmaznak. Glikozilált peptidek izolálására főként lektin affinitás kromatográfiát használnak (10), de leírtak ERLIC kromatográfiát (9) és titán-

dioxidon (11) történő dúsítást is. A mi célunk glikozilációs és foszforilációs módosítások vizsgálata szekretált fehérjéken. Munkánk során immobilizált fém-affinitás kromatográfiás eljárást alkalmaztunk szérumból történő foszfopeptid dúsításra, továbbá megvizsgáltuk, hogy a módszer alkalmas-e glikopeptidek izolálására. Kísérleteinkben vas (III) és aluminium (III)-ionokat immobilizáltunk nitrilotriacetát (NTA) funkciós csoportot hordozó mágneses agaróz gyöngyre. A felkötési és eluálási lépéseket változtatva kerestük a két módosítás szelektív dúsítását biztosító körülményeket.

ANYAG ÉS MÓDSZER

MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE

Marha szérumból (FBS) és Humán szérumból (HS) emésztése FASP (Filter Aided Sample Preparation) módszerrel

500 µl marha- és 500 µl humán szérumból hozzáadtunk 760mg guanidínHCl-t, 6.83 mg ditiotreitolt (DTT) és 34 µl 3.5 M Tris pH 7,5 puffert. Ezt 95 °C-on inkubáltuk 30 percig. Ezután a mintát 12 részre osztva 30k szűrővel ellátott csőben 20 percen át 20 °C-on 14000 g-vel centrifugáltuk. A szűrő tetején maradt oldatot kétszer mostuk 200 µl 8M karbamid/100 mM Tris oldattal, ismételten 20 percen át 20 °C 14000 g-n centrifugálva. A diszulfidok DTT-vel történt redukálásakor képződő szabad –SH csoportokat 200 mM jódiacetamid/ 8 M karbamid-Tris oldatban alkiláltuk 30 percig sötétben, amit három mosás követett 200 µl 8 M karbamid/ 100 mM Tris oldattal és további három mosás 50 mM ammónium bikarbonát pH 8,5 oldattal. Ezután minden csőhöz 0,1 mg tripszint adtunk 100 µl 50 mM ammónium bikarbonát pH 8,5 oldatban, és egy éjszakán át rázatva inkubáltuk 37 °C-on. Az emésztést 50 µl 1% hangyasav oldattal állítottuk le, majd az emésztményt tiszta csőbe centrifugáltuk 20 °C-on 20 percig 14000 g-vel. A szűrő tetejét további 100 µl 0,1 % hangyasav oldattal mostuk, amit hozzácentrifugáltunk 14000 g 20 percig 20 °C az emésztményhez. A mintákat beszárítottuk, majd vízzel 100 µg/µl koncentrációjú törzsoldatot készítettünk, amit -20 °C-on tároltunk.

ESZKÖZÖK

IMAC-gyanta előkészítése

Fe(III)- és Al(III)-NTA gyantát mágneses Ni(II)-NTA agaróz 5%-os szuszpenziójából készítettünk a fémion lecserélésével a következő módon. A Ni(II)-NTA agaróz gyantát háromszor mostuk vízzel. Ezután a gyantát 100 mM EDTA oldattal rázattuk 30 percig, hogy a Ni(II)-ionokat eltávolítsuk. Háromszoros vizes mosás után 10mM FeCl₃ vagy Al₂(SO₄)₃ oldattal inkubáltuk a gyantát 30 percig. Újabb háromszoros vizes mosás után a gyantához acetonitril/metanol/0.01% ecetsav 1:1:1 arányú elegyét adtuk, hogy 5%-os szuszpenziót kapjunk. Az így előkészített gyantát 4 °C-on tároltuk. (12)

SZÉRUM EMÉSZTMÉNYEK DÚSÍTÁSA

A kísérletekben 100 µg mennyiségű fehérjének megfelelő mennyiségű szérum emésztményt dúsítottunk 50 µl 5%-os Fe(III)- vagy Al(III)-NTA szuszpenzió az alábbiak szerint. A gyantát kétszer mostuk a felkötő oldat 100µl-ével. A szérum emésztmény 100 µg/µl koncentrációjú törzsoldatából 1 µl-t 500 µl-re hígítottuk a felkötő oldattal, amit a gyantához adva 30 percig rázattunk. Fe(III)-NTA-n történő dúsításnál háromféle felkötő oldatot teszteltünk: 1) 0,1% trifluoroecetsav/ 80% acetonitril, 2) 100mM ammónium acetát pH7/ 50% acetonitril, 3) 0,1% trifluoroecetsav/ 80% metanol. Az Al(III)-NTA-n történő dúsítás során a felkötést 100mM ammónium acetát pH7/ 50% acetonitril oldatban végeztük. A felkötés után a gyantát négyszer mostuk 500 µl felkötő oldattal. Végül a gyantán dúsult peptideket egy lépésben 100 µl 1% ammónia/ 50% acetonitril oldattal szorítottuk le, vagy két lépésben előbb 500 µl 100 mM ecetsav/ 50% acetonitril oldattal, majd 100 µl 1% ammónia/ 50% acetonitril oldattal. A mintákat beszárítottuk, majd 50µl 0,1% hangyasav oldatban visszaoldottuk.

TÖMEGSPEKTROMETRIAI ANALÍZIS ÉS ADATOK KIÉRTÉKELÉSE

A dúsítmányokat on-line LC-MS/MS analízisnek vetettük alá Thermo LTQ Orbitrap Elite készülékkel. A minták 1/10-ét injektáltuk fel az előtét oszlopra 0% B-ben, majd gardiens elúcióval kromatografáltuk 100 perc alatt növelve a B oldószert 0-40%-ra (A oldószer: 0,1% hangyasav/ víz; B oldószer: 0,1% hangyasav/ acetonitril). Az adatgyűjtés során a 3 legintenzívebb, többszörösen töltött ionról vettünk fel HCD spektrumot, és amennyiben a HCD

spektrum tartalmazott diagnosztikus oxónium ionokat (204,0867; 366,1395), akkor azt a prekuzort ETD fragmentálásnak is alávetettük. A csúcslistákat PAVA-val (2010.09.30 verzió) generáltuk, majd az adatokat a ProteinProspector programcsomaggal (5.12.2 verzió) kerestük le a Uniprot 2014.7.15-i adatbázison Bos taurus vagy humán fehérjékre. A lekeresések során 5ppm pontosságot használtunk a prekuzorra, 20ppm pontosságot az orbitrapben mért HCD fragmensekre és 0,8Da pontosságot az ioncsapdában mért ETD fragmensekre. Féltriptikus hasításokat engedélyeztünk 1 kihagyott hasítóhellyel. Két lekeresést hajtottunk végre, külön véve figyelembe Ser/Thr/Tyr foszforilációt vagy Ser/Thr oldalláncon HexNAcHexSA és HexNAcHexSA2 módosítást. Állandó módosításként Cys karbamidometileződést állítottunk be, lehetséges módosításként a foszforiláció illetve O-glikoziláció mellett az N-terminális Gln gyűrűzárását piroglutaminná, valamint Met oxidációt és fehérje N-terminális acetilezést engedélyeztünk. Egy peptiden belül 3 változó módosítást engedélyeztünk. Elfogadási paraméterek: minimum fehérje/peptid pontszám:25, maximum fehérje/peptid E-érték: 0,05.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

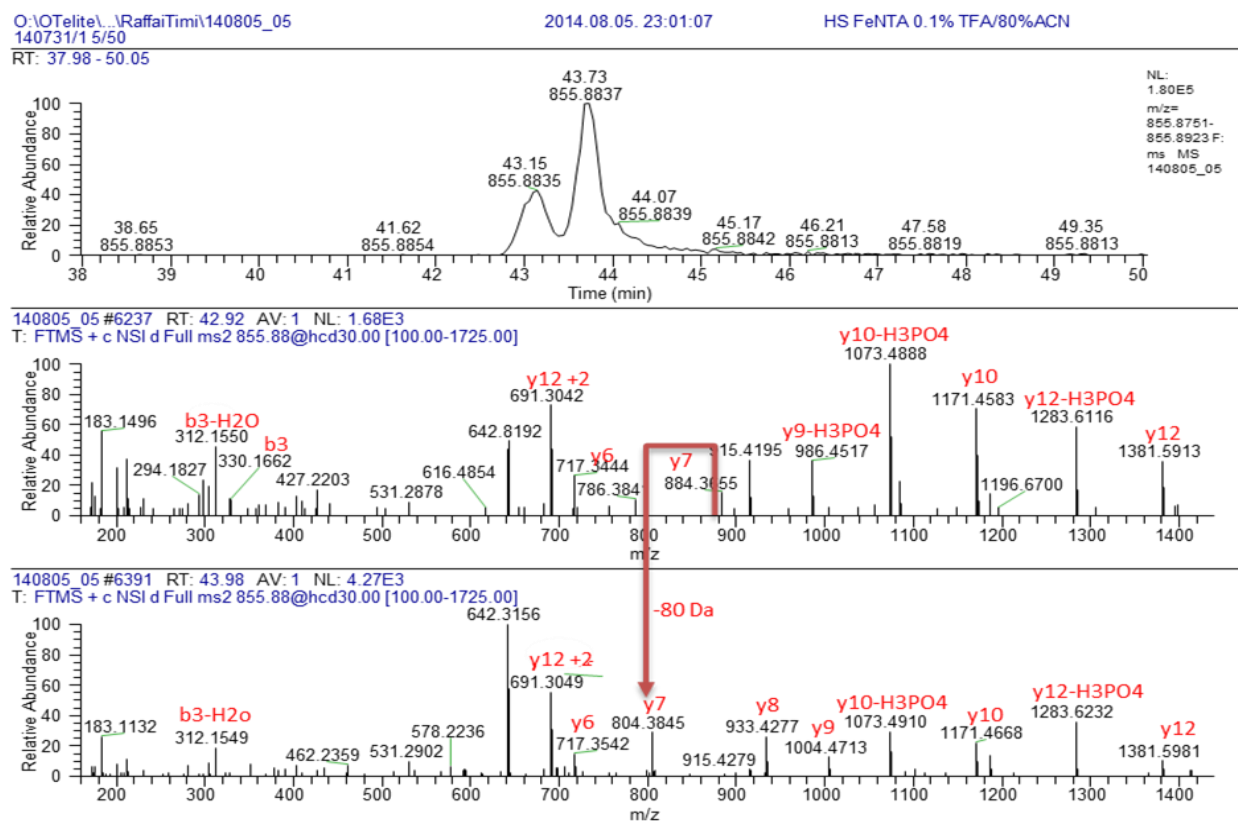
A foszfopeptidek dúsítására használt immobilizált fém-affinitás kromatográfiás (IMAC) eljárás azon alapszik, hogy a szilárd hordozóra immobilizált kelátképző által koordinált fémionok nagy affinitással kötik a peptidek foszfát csoportjait. A leggyakrabban alkalmazott fémion a Fe(III). Standard foszfopeptidekkel és foszforilált fehérje emésztménnyel végzett előkísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy az Al(III) is hatékonyan képes dúsítani a foszfopeptideket. Jelen kísérleteinkben ezen két fémion hatékonyságát vizsgáltuk marha és humán szérumban triptikus emésztményéből történő foszfopeptid dúsításra. Fe(III)-NTA esetén az irodalomból vett dúsítási körülményt használtuk: 0,1% trifluoroecetsav/ 80% acetonitril (12), míg Al(III)-NTA esetén az előkísérletek során optimalizált körülményt: 0,1M ammónium-acetát pH 7/50% acetonitril. A két fémionnal közel azonos foszforilációs helyeket azonosítottunk az adatbázis lekeresés során (1. táblázat).

	aluminium (III)-NTA	vas (III)-NTA
Protein Name	0,1 M ammóniumacetát/ 50% ACN	0,1% TFA/ 80% CAN
1 Serum albumin	S82	S82
2 Alpha-2-HS-glycoprotein	S138, S321, S328/S330	S138, S330
3 Kininogen-1	S23, T326/ T327/S329, S332	T326/T327/S329/ S332
4 Alpha-1-antichymotrypsin	T35	T35
5 Apolipoprotein L1	S311, S314	S311, S314
6 Haptoglobin		S21
7 Antithrombin-III	S68	S68
8 Fibrinogen alpha chain		S364/S365
9 Coagulation factor V	S859	
/-nincs meghatározva pontosan melyik aminosav foszforilálódott		

1.táblázat Humán szérumban azonosított foszforilációs helyek

Ezek a foszforilációs helyek az abundánsabb szérumban fehérjékhez rendelhetők. Az Alpha-2-HS-glycoprotein, Kininogen 1 és Apolipoprotein L1 fehérjén több foszforilációs helyet is igazoltunk. A 1. ábra mutatja a humán Apolipoprotein L1 fehérje két foszforilációs helyének (Ser-311 és Ser-314) azonosítását. A két foszforilációs hely azonos triptikus peptidre esik. A két módosítási hely azonosítását az segítette, hogy a két foszfo-izofорма a kromatográfia során elvált, továbbá a két izofорма fragmentációja a módosítás pontos helyét igazoló fragmentumokat eredményezett:

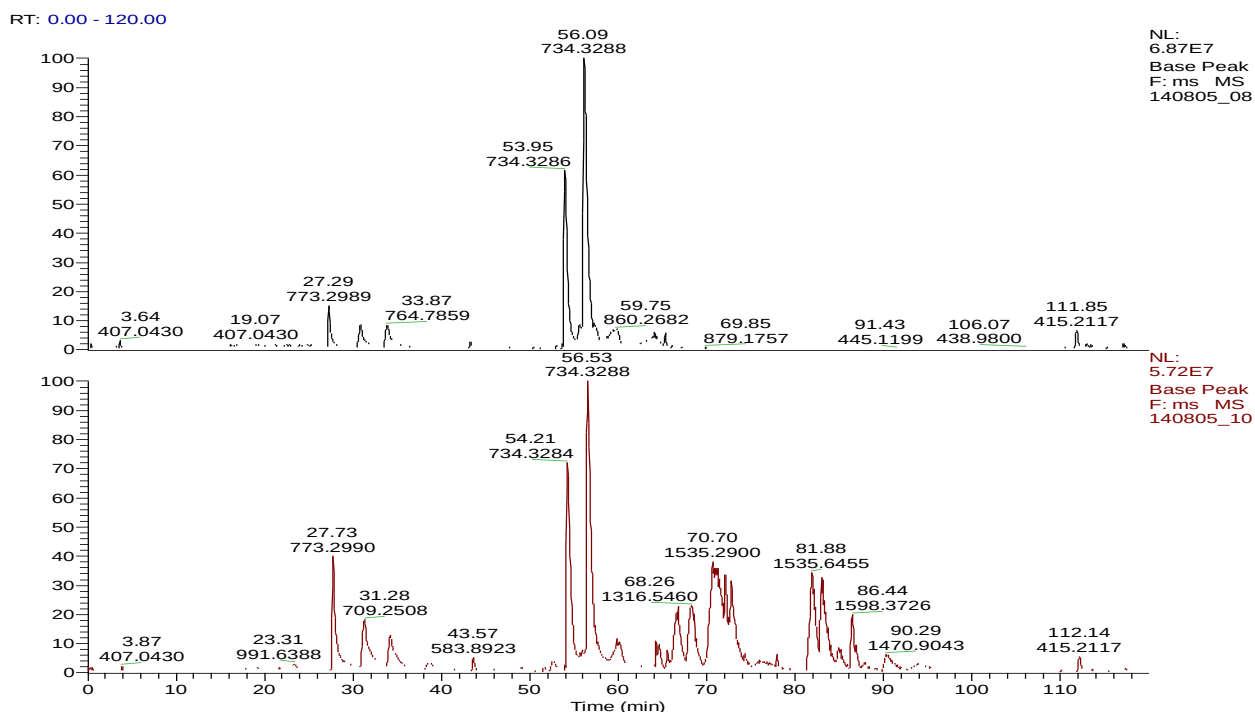
mindkét izoforma esetén a b_3 fragmenst módosítás nélkül detektáltuk, ami alapján a Thr-307 foszforilációja kizárható, az y_7 fragmenst az egyik esetben módosítatlanul (m/z 804.3845), míg a másik esetben módosítva (m/z 884.3655) detektáltuk, az y_{10} fragmenseket mindkét izoforma esetén módosítva detektáltuk, így igazolva a Ser-311 és a Ser-314 foszforilációját.



1.ábra Humán Apolipoprotein L1 fehérje foszforilációs helyeinek meghatározása. Felső panel: a VTEPISAESGEQVER [306-320] triptikus peptid két foszfo-izomformája (m/z 855.8835) a kromatográfia során elvált. Középső panel: a fehérje a Ser-314 oldalláncon foszforilált. Alsó panel: a fehérje a Ser-311 oldalláncon foszforilált.

A mérési eredmények kiértékelése során arra lettünk figyelmesek, hogy a Fe(III)-NTA-n nyert dúsítmányban számos fragmentációs spektrum glikopeptidekre jellemző oxónium ionokat (m/z 204,086; 292,092; 366,138) és szénhidrát gyököknek megfelelő távolságra ionsorozatot tartalmazott. Megvizsgáltuk, hogy a detektált fragmentációs spektrumok hány százaléka tartalmazta a glikopeptidekre általánosan jellemző N-acetil hexózamin oxónium ionot (m/z 204,086) A Fe(III)-NTA-n dúsított marha szérum emésztmény esetében a prekursorok 60.2% tartalmazta a diagnosztikus fragmenst, humán szérum emésztmény esetében pedig a prekursorok

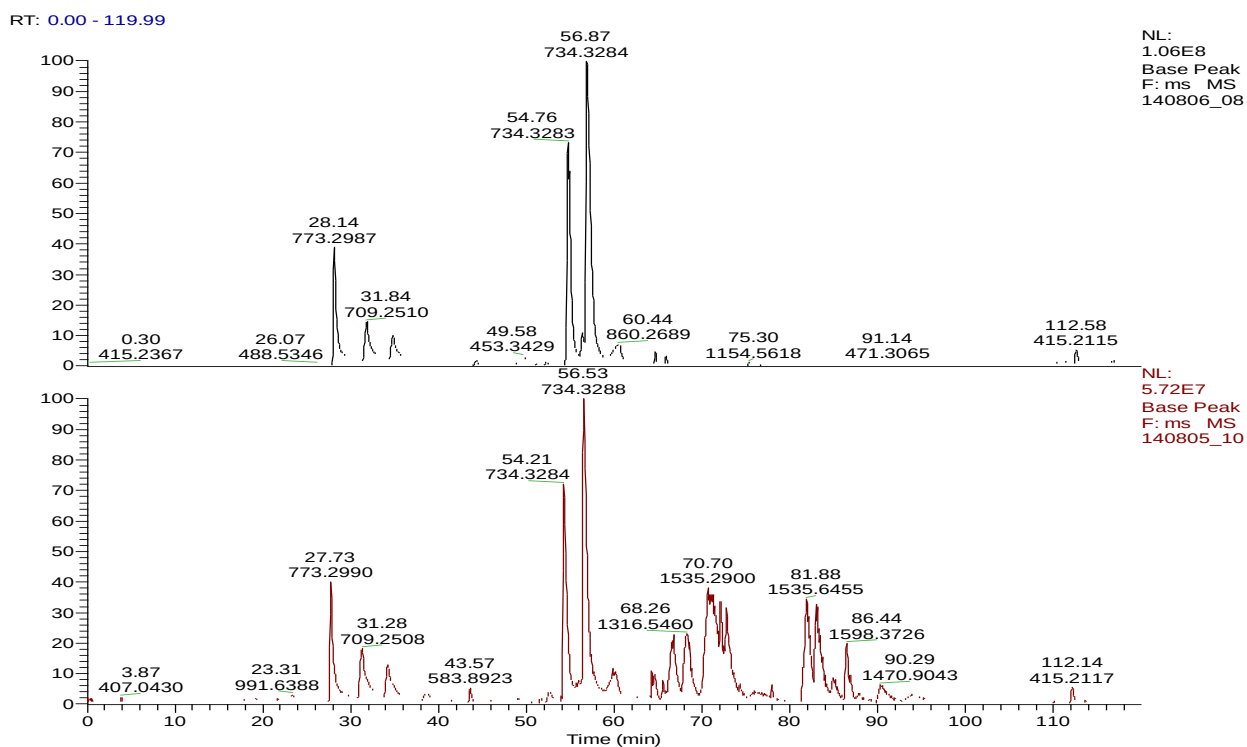
75,25%-a. Az Al-NTA-n dúsított marha szérum emésztményben a prekursorok mindössze 0,11%-a, humán szérum esetén pedig 1%-a volt glikopeptid. Ez alapján megállapítottuk, hogy a Fe(III)-NTA esetében a foszfopeptidek mellett jelentős mértékben dúsultak glikopeptidek is. Összehasonlítva a két fémionnal dúsított minták báziscsúcs kromatogramjait, a különbséget a Fe(III)-NTA-n feldúsult glikopeptidek adják (2. ábra).



2. ábra Marha szérum emésztmény dúsítmányainak báziscsúcs kromatogramja. Felső panel aluminium(III)-NTA dúsítás 0,1 M ammóniumacetát/ 50% acetonitril. Alsó panel: vas(III)-NTA dúsítás 0,1% trifluoroecetsav/ 80% acetonitril.

Ezek után felvetődött a kérdés, hogy a glikopeptidek dúsulása Fe(III)-NTA-n a fémionnak vagy a felkötő körülményeknek köszönhető-e. Ezért a Fe(III)-NTA-n történő dúsítást megismételtük az aluminiumra optimalizált körülmény mellett is. Ennek eredményeként a foszfopeptidek továbbra is jól dúsultak, azonban a glikopeptidek nem, a prekursorok mindössze 0,07%-a tartalmazta a diagnosztikus oxónium iont (m/z 204.086). Ezekből az eredményekből arra a következtetésre jutottunk, hogy a glikopeptidek dúsulásában a felkötés körülményeinek meghatározó szerepe van. Mivel a vas(III)-NTA-n végzett dúsítás felkötő körülménye (0,1% trifluoroecetsav/ 80% acetonitril) nagymértékben hasonlít az ERLIC kromatográfia során

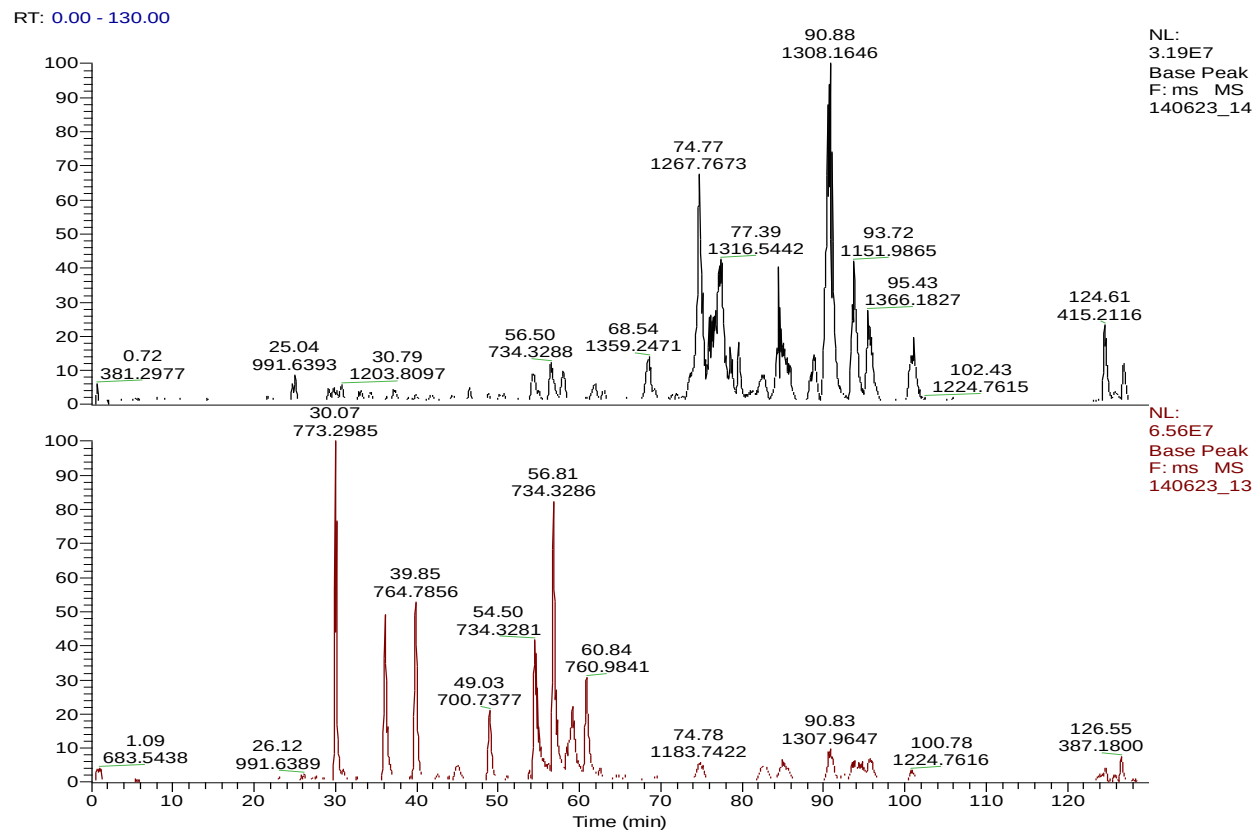
alkalmazott kiindulási körülményekhez (0,1% hangyasav/70-90% acetonitril), ezért azt feltételeztük, hogy a glikopeptidek dúsulásának háttérében hidrofил kölcsönhatások állnak. Ennek megerősítésére a vas(III)-NTA gyantán történő dúsítást úgy is megismételtük, hogy a felkötő oldatban az apoláros acetonitrilt egy polárosabb oldószerrel, metilalkohollal helyettesítettük. A 0,1% trifluoroecetsav/ 80% acetonitrilben és 0,1% trifluoroecetsav/ 80% metanolban nyert dúsítmányok báziscsúcs kromatogramjait (3.ábra) összehasonlítva azt találtuk, hogy az acetonitriles dúsítás során detektált glikopeptid csúcsok a metanolos dúsítmányból hiányoznak. Az adatokból generált csúcslistának az m/z 204.086 diagnosztikus oxónium ionra végzett szűrése megerősítette, hogy a marha szérumban a polárosabb oldószer esetén a prekursorok mindössze 1,6%-a glikopeptid. Tehát igazoltuk, hogy a glikopeptidek dúsulásában a hidrofил kölcsönhatások a meghatározóak.



3.ábra Marha szérumban emésztmény dúsítmányainak báziscsúcs kromatogramja. Felső panel vas(III)-NTA dúsítás 0,1 % trifluoroecetsav/ 80% metilalkohol. Alsó panel: vas(III)-NTA dúsítás 0,1% trifluoroecetsav/ 80% acetonitril.

Ezen eredmények alapján olyan dúsítási protokollt dolgoztunk ki, amely lehetővé teszi, hogy a foszfo- és glikopeptideket külön analizáljuk. A módszer első lépéseként vas(III)-NTA gyantára 0,1% trifluoroecetsav/ 80% acetonitril oldatban együtt kötöttük fel a gliko- és

foszfopeptideket. Ezután egymást követő, kétlépéses elúcióval először a glikopeptideket szorítottuk le a gyantáról 0,1 M ecetsav/ 50% acetonitrillel, ezt követően pedig a foszfopeptideket eluáltuk 1% ammónia/ 50% acetonitrilben. A báziscsúcs kromatogramok alapján az első eluátumban jó hatékonysággal és szelektivitással sikerült a glikopeptideket lezorítani, míg a foszfopeptidek a második lépésben eluálódtak (4. ábra).



4. Marha szérum emésztmény dúsítmányainak báziscsúcs kromatogramja. Vas(III)-NTA felkötés 0,1 % trifluoroeecetsav/ 80% acetonitrilben. Felső panel: 0,1 M ecetsav/ 50% acetonitrilben eluálás. Alsó panel: 1% ammónia / 50% acetonitrilben eluálás.

ÖSSZEGZÉS

Munkánk során fém-affinitási kromatográfiás eljárást (IMAC) alkalmazva dúsítottunk foszfo- és glikopeptideket humán és marha szérumból. Kétféle fémiont használtunk a dúsítására: alumínium(III) és vas(III) ionokat, amelyek eltérő optimális felkötő körülményeket igényelnek. Azt tapasztaltuk, hogy az alumínium(III)-NTA esetében csak a foszfopeptidek, míg a vas(III)-NTA-n történő dúsítás alkalomával foszfo- és glikopeptidek egyaránt dúsultak. Ennek eldöntésére, hogy a glikopeptidek dúsulása a fémion vagy a felkötési körülményeknek tudható be, a vas(III)-NTA gyantán történő dúsítást elvégeztük az alumínium(III)-NTA gyantára optimalizált körülmények között is. A dúsítmányban túlnyomó részt foszfopeptideket detektáltunk. Ez azt a következtetést vonta maga után, hogy nem a fémion, hanem a felkötő körülményeknek van meghatározó szerepe a glikopeptidek dúsulásában. Mivel a vas(III)-NTA felkötő körülményei hasonlóak az ERLIC kromatográfiás eljárás kiindulási körülményeihez, arra gondoltunk, hogy a glikopeptidek kötődése a hordozóra hidrofíl kölcsönhatások által valósulhat meg. Ezt megerősítendő, a vas(III)-NTA felkötő oldatának apoláros komponensét polárosabb komponensre cseréltük és azt tapasztaltuk, hogy a hidrofílebb körülmények között a glikopeptidek nem kötődtek fel a hordozóra, csak a foszfopeptidek dúsultak fel. Ezek alapján egy olyan dúsítási eljárást hoztunk létre Fe(III)-NTA-n, amely során kétlépéses elúcióval a gliko- és foszfopeptidek elválaszthatóak és külön analizálhatóak.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Bodenmiller B, Mueller LN, Mueller M, Domon B, Aebersold R. Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome. *Nat Methods*. 2007 Mar;4(3):231-7.
2. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Dec 6;1473(1):4-8.
3. Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*. 1993 Apr;3(2):97-130.

4. Andersch-Björkman Y, Thomsson KA, Holmén Larsson JM, Ekerhovd E, Hansson GC. Large scale identification of proteins, mucins, and their O-glycosylation in the endocervical mucus during the menstrual cycle. *Mol Cell Proteomics*. 2007 Apr;6(4):708-16.
5. Drake RR, Schwegler EE, Malik G, Diaz J, Block T, Mehta A, Semmes OJ. Lectin capture strategies combined with mass spectrometry for the discovery of serum glycoprotein biomarkers. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Oct;5(10):1957-67.
6. Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON, Roepstorff P, Jørgensen TJ. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Jul;4(7):873-86
7. Darula Z, Medzihradszky KF. Affinity enrichment and characterization of mucin core-1 type glycopeptides from bovine serum. *Mol Cell Proteomics*. 2009 Nov;8(11):2515-26.
8. Zarei M, Sprenger A, Gretzmeier C, Dengjel J. Combinatorial use of electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography (ERLIC) and strong cation exchange (SCX) chromatography for in-depth phosphoproteome analysis. *J Proteome Res*. 2012 Aug 3;11(8):4269-76.
9. Hao P, Zhang H, Sze SK. Application of electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography to the characterization of proteome, glycoproteome, and phosphoproteome using nano LC-MS/MS. *Methods Mol Biol*. 2011;790:305-18
10. Song E, Zhu R, Hammoud ZT, Mechref Y. LC-MS/MS Quantitation of Esophagus Disease Blood Serum Glycoproteins by Enrichment with Hydrazide Chemistry and Lectin Affinity Chromatography. *J Proteome Res*. 2014 Nov 7;13(11):4808-20.
11. Larsen MR, Jensen SS, Jakobsen LA, Heegaard NH. Exploring the sialome using titanium dioxide chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2007 Oct;6(10):1778-87.
12. Vincent J. Cheng, Jarrod A. Marto. Magnetic Bead Processor for Rapid Evaluation and Optimization of Parameters for Phosphopeptide Enrichment. *Analytical Chemistry*, 2009, 81 (11), 4566-4575.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek dr Klement Évának, hogy lehetőséget kaptam a Proteomikai Laboratórium kutatásaiba bekapcsolódni, hogy részt vehettem egy érdekes kutatási munkában, valamint külön köszönöm segítségét és odafigyelését.

Köszönöm a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Proteomikai Laboratórium munkatársainak, hogy megtanították a használt módszereket, elláttak hasznos tanácsokkal és türelemmel oktattak a mindennapokban.

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Rafai Timea a dolgozatban leírt munka folyamatok közül a:

- az előkészített peptid emésztmények dúsítását
- a dúsítmányok tömegspektrometriás analízisét
- a tömegspektrometriai adatok kiértékelését

végezetem el.

Szeged, 2014 november 13.

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Rafai Timea a dolgozatban leírt munka folyamatok közül a:

- az előkészített peptid emésztmények dúsítását
- a dúsítmányok tömegspektrometriás analízisét
- a tömegspektrometriai adatok kiértékelését

végezetem el.



Szeged, 2014 november 13.