

——— Tudományos Diákköri Dolgozat ———

BALBISI MIRJAM

**ALK génátrendeződést mutató
tüdőtumoros minták
proteomikai vizsgálata**

Témavezetők:

Dr. Turiák Lilla, tudományos főmunkatárs
Tóth Gábor, tudományos segédmunkatárs
Konzulens: Dr. Szász A. Marcell

ELKH Természettudományi Kutatóközpont
MS Proteomika Kutatócsoport



——— Eötvös Loránd Tudományegyetem ———
——— Természettudományi Kar ———
—— Budapest, 2021 ——

Lezárás dátuma: 2021. 12. 06.

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3
1. Bevezetés és célkitűzések.....	4
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. Proteomika	6
2.1.1. Tradicionális proteomikai megközelítések.....	6
2.1.2. Tömegspektrometria alapú proteomika	7
2.2. Szilárdfázisú extrakció	11
2.2.1. A dolgozatban alkalmazott állófázisok bemutatása	13
2.3. ALK génátrendeződést mutató tüdőrák	15
2.3.1. Nem kissejtes tüdőrák és annak célzott terápiás kezelési lehetőségei.....	15
2.3.2. ALK génátrendeződéssel járó NSCLC azonosítása	17
2.3.3. Tumorok besorolása és heterogenitása	18
3. Anyagok és módszerek.....	19
3.1. Felhasznált anyagok	19
3.2. SPE módszerek vizsgálata.....	19
3.2.1. Minták előkészítése	19
3.2.2. Szilárdfázisú extrakciós tisztítási módszerek	20
3.3. ALK génátrendeződést mutató tüdőszövetek vizsgálata.....	22
3.3.2. Szövetfelületi emésztés	23
3.3.3. Szilárdfázisú extrakciós tisztítás.....	23
3.4. Műszeres analitikai vizsgálatok	24
3.4.1. HPLC elválasztás paraméterei.....	24
3.4.2. MS módszer paraméterei	24
3.5. Mérési eredmények értékelése	25
4. Eredmények és értékelésük	27
4.1. Szilárdfázisú extrakciós módszerek összehasonlítása.....	27
4.1.1. SPE módszerek összehasonlítása szokványos hidrofobicitás-eloszlású proteomikai minták tisztítása esetén.....	27
4.1.2. SPE módszerek összehasonlítása hidrofil minták tisztítása esetén	32
4.1.3. SPE eredmények általános összevetése.....	36
4.2. ALK génátrendeződést mutató tüdőszövetek proteomikai vizsgálata	38
4.2.1. Eltérő patológiai besorolású szöveti régiók fehérjéinek minőségi összehasonlítása.....	38
4.2.2. Eltérő mucintartalmú szöveti régiók fehérjéinek minőségi összehasonlítása	41
4.2.3. Fehérjemennyiségi analízis eredményei.....	43
4.2.4. Eredmények értékelése, kitekintés	52
5. Összefoglalás.....	54
6. Köszönetnyilvánítás	56
7. Irodalomjegyzék.....	57
8. Függelék	61

Rövidítésjegyzék

ACN – acetonitril

ALK – anaplasztikus limfóma kináz, receptor tirozin kináz

BRAF – rapidan gyosuló fibrosarcoma B, proto-onkogén, szerin/treonin kináz

CE – kapilláris elektroforézis

C₈ / C₁₈ – oktil / oktadecil láncal borított szilikagél alapú töltet

CID – ütközés indukált disszociáció

DDA – adatfüggő MS/MS mérés

DIA – adatfüggetlen MS/MS mérés

DTT – ditiotritol

EGFR – epidermális növekedési faktor receptor

EML4 – echinoderm mikrotubulus asszociált fehérje 4

ERLIC – elektrosztatikus taszításon alapuló hidrofíli interakciós kromatográfia

ESI – elektroporlasztásos ionizáció

FA – hangyasav

FDR – téves azonosítás valószínűsége

FFPE – formalin-fixált, paraffinba ágyazott szövet

FISH – fluoreszcens in situ hibridizáció

GAG – glükózaminoglikán

H&E – hematoxin-eozin festék

HER2 – humán epidermális növekedési faktor receptor 2

HFBA – heptafluoro-vajsav

HILIC – hidrofíli interakciós kromatográfia

HPLC – nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

IHC – immunhisztokémia

KRAS – Kirsten patkány sarcoma, proto-onkogén, GTP-áz

LFQ – jelölésmentes mennyiségi meghatározás

MALDI – mátrixszal segített lézer deszorpció/ionizáció

MeOH – metanol

MET – MET proto-onkogén, receptor tirozin kináz

MS – tömegspektrometria, tömegspektrométer

MS/MS – tandem tömegspektrometria

m/z – fajlagos tömeg (tömeg/töltés)

nanoUHPLC – nanoáramlásos ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

NSCLC – nem kissejtes tüdőrák

NTRK – neurotrofikus tirozin receptor kináz

PCR – polimeráz láncreakció

PD-1 – programozott sejthalál receptor-1

PD-L1 – programozott sejthalál receptor-1 liganduma

PFPA – pentafluoro-propionsav

PTM – poszt-transzlációs módosulás

Q – kvadrupól analízátor

RET – transzfekció során újraszerveződő fehérje, proto-onkogén

ROS1 – ROS proto-onkogén 1, receptor tirozin kináz

SPE – szilárdfázisú extrakció

TFA – trifluorecetsav

TOF – repülési idő analízátor

1. Bevezetés és célkitűzések

A rosszindulatú daganatos megbetegedések napjainkban a vezető halálozási okok közé tartoznak¹, ezért a tudományos kutatásokban rendkívül nagy hangsúly kerül a rák diagnosztikus és terápiás lehetőségeinek fejlesztésére. A különböző daganattípusok közül a tüdőrák felelős a megbetegedések és a halálozások jelentős részéért: napjainkban az első helyen áll a statisztikák szerint a halálozás tekintetében². A tüdőráktípusok legnagyobb csoportja a nem kissejtes tüdőrák (NSCLC), melynek hátterében számos gén valamelyikének átrendeződése állhat. Az egyik ilyen onkogén az anaplasztikus limfóma kinázt kódoló, röviden ALK gén. A génátrendeződés azonosítása a rutin diagnosztikában fontos szereppel bír terápiás szempontból, mivel e genetikai eltérésnek a kezelésére már létezik molekuláris célzott terápiás lehetőség (pl. crizotinib, ceritinib, alectinib, brigatinib)^{3,4}.

TDK munkám során ALK génátrendeződést mutató tüdőtumorok átfogó proteomikai elemzését végeztem el. A szövetminták vizsgálata bevett gyakorlatnak számít a proteomikában, mivel a szövetek a testfolyadékokkal (pl. vér, plazma, vizelet) ellentétben nem tartalmaznak egyes fehérjéket olyan nagy mennyiségben, hogy az a többi jelenlévő fehérje analitikai jelét elnyomja, detektálását megnehezítse. A komplex biológiai minták fehérjetartalmának minőségi és mennyiségi vizsgálatára az egyik legalkalmasabb technika a nanoáramlásos ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria (nanoUHPLC-MS/MS). Ennek a nagyérzékenységű analitikai módszernek az alkalmazása lehetőséget teremt olyan biomarkerek azonosítására, melyek vizsgálatával kis mintamennyiségből, egyszerűen lehetséges a tumor diagnosztizálása és akár előrejelzése is. Azonban a proteomikai munkafolyamat egy komplex, sok lépésből álló eljárás. Az egyes lépések külön-külön történő optimalálása elengedhetetlen ahhoz, hogy több fehérje váljon minőségileg és mennyiségileg vizsgálhatóvá, és a biológiai minták elemzése során minél több hasznos biológiai információ legyen kinyerhető az adatokból.

Ezért munkám első részében célul tűztem ki a proteomikai munkafolyamat egyik lépésének, a minta enzimatis hasítást követő tisztításának az optimalálását. A minta tisztítására a legelterjedtebb módszer a szilárdfázisú extrakció, amelyhez számos állófázis és tisztítási protokoll létezik. Kutatásom során céлом volt megvizsgálni, hogy a proteomikában általánosan alkalmazott szilárdfázisú extrakciós tisztítások közül melyik módszer alkalmazásával érhető el a legjobb hatékonyság. Munkám második részében tüdőminták vizsgálatával foglalkoztam, melyek tisztításához az eredményeim alapján optimális módszert alkalmaztam.

Az ALK-pozitív tüdőtumорок vizsgálata kapcsán célom volt megállapítani, hogy a környező normál és tumoros, illetve a különböző típusú tumoros mintákban (mucinózus, tubuláris, papilláris, szolid) azonosított fehérjék között megfigyelhetők-e olyan minőségi és mennyiségi változások, melyek alkalmasak lehetnek diagnosztikus célra. Az eredmények biológiai értelmezését statisztikai vizsgálatokkal és fehérje interakciós hálózatok elemzésével végeztem. További célom volt, hogy a proteomikai eredmények alapján következtessenek azokra a biokémiai folyamatokra, melyek a környező normál és tumoros, vagy különböző típusú tumoros szövetekben eltérőek lehetnek, hogy jövőbeni potenciális gyógyszeres úton kezelhető célpontokat azonosítsak.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Proteomika

2.1.1. Tradicionális proteomikai megközelítések

A proteomika definíció szerint a proteom, azaz **a genom által kódolt teljes fehérjekészlet vizsgálatával foglalkozó tudományág**⁵. A fehérjék elemzése többletinformációt hordoz a genomikához képest, mert bár az expresszált fehérje aminosav szekvenciáját az azt kódoló DNS-szakasz, a gén szabja meg, de a fehérje mennyisége és annak poszt-transzlációs módosulásai az élő szervezet aktuális állapotától függően változhatnak^{6,7}. A proteomika egyik kiemelten fontos kutatási iránya, hogy egészséges és tumoros szövetek proteomikai profiljának összehasonlításával a két biológiai csoport közötti különbségeket azonosítsa, ami potenciális biomarkerek felfedezése mellett **a tumorképződés biológiai hátterének megértéséhez is hozzájárul**⁸.

A proteomikában a fehérjék elválasztása és detektálása különböző analitikai módszerekkel történik. Az alkalmazható technikák egyik csoportja a **gélalapú eljárások**. A klasszikus gélalapú proteomika során a vizsgált biológiai mintából származó fehérjekeveréket megfuttatjuk egy kétdimenziós gélen, ahol az elválasztás egyik dimenzióban méret, másik dimenzióban izoelektromos pont szerint történik. Ezután a vizsgálat tárgyát képező fehérjék pontjait kivágjuk és enzimatikusan peptidekké emésztjük. A keletkező peptideket tandem tömegspektrometria (tandem MS, MS/MS) segítségével mérjük meg, majd számítógépes programokkal azonosítjuk a fehérjéket és meghatározzuk a mennyiségüket. A gélalapú technikák fő hátránya, hogy sokszor nem megfelelő az elválasztás és egy foltban több fehérje is található^{9,10}.

Egyes kiválasztott fehérjék minőségi és mennyiségi elemzésére alkalmazhatók **antitest alapú módszerek** is, például az ELISA és a Western blot technika. Az ELISA lényege, hogy a reakcióedény aljához kötött antitest megkötí a mintából származó antigén fehérjéket, a kötődést pedig egy enzim katalizált színreakció teszi láthatóvá¹¹. A Western blot technika alkalmazása során egy hagyományos kétdimenziós gélelektroforézist követően a komponenseket átvisszük egy másik membránra, majd egy specifikus fehérjéhez kötődő antitesttel inkubáljuk, és egy szekunder antitesttel színreakcióban mutatjuk ki a primer antitest bekötődési helyét¹². Ezeknek a módszereknek a hátránya, hogy antitest szükséges hozzájuk, nagy a minta- és időigényük, illetve csak egyetlen fehérje mennyiségi meghatározására alkalmasak.

A gél- és antitest alapú eljárások fent említett korlátai miatt, illetve a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) és a tömegspektrometria időközben bekövetkezett fejlődésének

és térhódításának köszönhetően **napjainkra a HPLC-MS vált a proteomika legfontosabb módszerévé.**

2.1.2. Tömegspektrometria alapú proteomika

A tömegspektrometria, mint detektálási módszer, a proteomikában számos előnnyel bír a klasszikus detektálási technikákhoz képest. Többek között nem igényel antitesteket, rendkívül kis mintamennyiség is elegendő hozzá, gyors, illetve egyszerre nagyszámú fehérje azonosítását és kvantifikálását teszi lehetővé. A tömegspektrometria alapú proteomika elterjedését jól mutatja, hogy számos területen alkalmazzák diagnosztikában és kutatásban egyaránt, többek között sejtek, sejt kultúrák, szövetek, vészérum és vérplazma, agy-gerincvelői folyadék, vizelet és nyál vizsgálatára¹³⁻¹⁶.

2.1.2.1. Műszerezettség

A tömegspektrometriában sokféle ionforrás és analizátor alkalmazható, melyek kombinációjaként rengetegféle készüléket különböztethetünk meg. Az ionforrás feladata, hogy a minta részecskéiből ionokat hozzon létre. A proteomikai munkafolyamat során, **peptidek és fehérjék vizsgálatára a mátrixszal segített lézer deszorpció/ionizáció (MALDI) és az elektroporlasztásos ionizáció (ESI) elterjedtek**¹⁷. Mindkét technika lágy ionizációs módszer, ami azt jelenti, hogy az ionizáció során jellemzően nem történik meg a molekulák fragmentációja, hanem intakt protonált molekulák képződnek és kerülnek detektálásra.

A hagyományos ESI egyik változata a nanoESI ionizáció, amit kifejezetten a korlátozott mennyiségben rendelkezésre álló minták tömegspektrometriás vizsgálatához fejlesztettek ki. Mivel a biológiai eredetű minták proteomikai vizsgálatához általában kis mennyiségű (< 10 µg) minta áll rendelkezésre, ezért gyakran célszerű a nanoESI ionizáció használata. A nanoESI ionizációnál alkalmazott kis áramlási sebesség mellett az ionizációs hatékonyság jelentősen megnő, ami jobb érzékenységet eredményez. A nanoESI online módon, nanoHPLC-hez kapcsolható¹⁸.

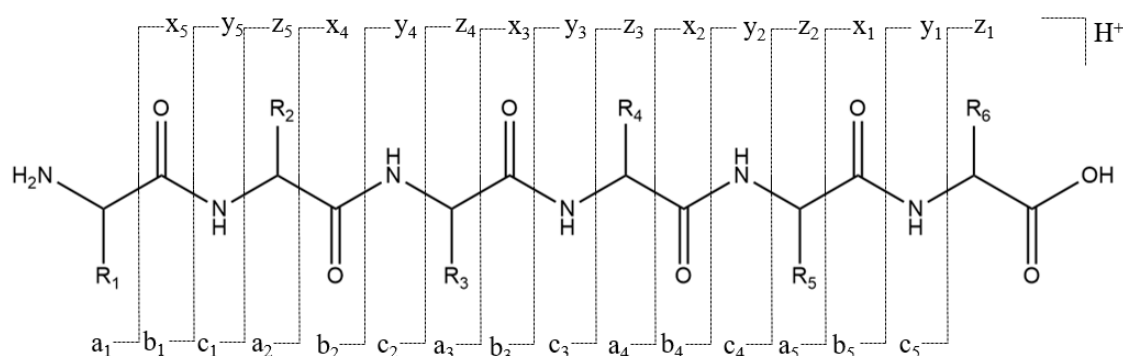
A tömegspektrométer másik fontos része az ionforrás mellett az analizátor, amely az ionokat tömeg/töltés (m/z) értékük szerint választja el. A leggyakrabban alkalmazott analizátorok közé tartoznak a kvadrupól (Q), a repülési idő (TOF) és az Orbitrap analizátorok¹⁷. A proteomikában fontos szerepe van a tandem tömegspektrometriának, mivel anélkül a peptidek és fehérjék aminosavsorrendjét nem lehetséges megbízhatóan meghatározni. Ezzel szemben tandem MS mérés során, **molekulák fragmentálásával szerkezeti információ is nyerhető** azok meghatározott fragmentációs sajátosságainak ismeretében. Tandem

tömegspektrometriára a csapdázásra alkalmas analizátorok és a több analizátort tartalmazó készülékek használhatók. Előbbi csoportba tartozik például az Orbitrap és az ioncsapda, utóbbiba pedig a hármass kvadrupól (QQQ), a TOF/TOF és a Q-TOF¹⁹.

2.1.2.2. A proteomika megközelítési módjai

A fehérjék MS analizálására több megközelítést is alkalmazhatunk. Ezek közül a legelterjedtebb az úgynevezett „**bottom-up**” stratégia, amely során a fehérjéket **peptidekké emésztjük** endopeptidáz enzimmel, pl. a lizin és arginin aminosavaknál hasító tripszinnel. A keletkező, viszonylag kis tömegű (~500-3000 Da) peptideket leggyakrabban HPLC vagy kapilláris elektroforézis (CE) segítségével választjuk el, majd bevezetjük az MS-be. A fehérjék azonosítása a peptidek tandem tömegspektrometriás fragmentációján alapul. Például egy ESI-Q-TOF készülék esetén az ESI ionizáció során keletkező, jellemzően többszörös töltésű peptidionok közül a kvadrupól analizátor kiválasztja a fragmentálni kívánt ionokat, melyek bejutnak a két analizátor közti ütközési cellába és ott kisebb darabokra esnek szét. A második, nagy felbontású TOF analizátorral meghatározható a fragmensionok m/z -e, melyből szoftveresen a peptid aminosavsorrendje is megállapítható. A peptidekről nyert információ alapján, szintén számítógépes szoftverek segítségével következtetünk arra, hogy milyen fehérjéket mekkora mennyiségben tartalmazott a kiindulási minta. A „**bottom-up**” proteomika **legfontosabb előnye a módszer kimagasló érzékenysége**, ugyanakkor hátránya, hogy a peptidek sokszor nem rendelhetők hozzá kizárólag egyetlen fehérjéhez, illetve a poszt-transzlációs módosulásokkal kapcsolatos információk gyakran elvesznek^{8,20}. Kísérleteimhez én is a „**bottom-up**” stratégiát alkalmaztam.

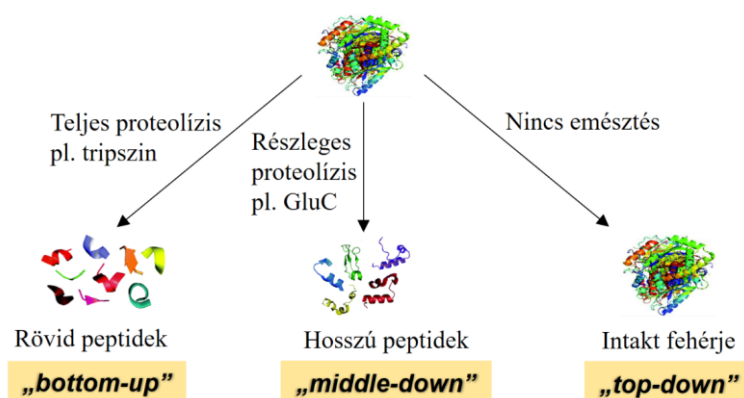
A peptidek szerkezetének meghatározásához szükséges a fragmentálásuk kisebb darabokra, ami az ütközési cellában történő ütköztetési aktiválással érhető el¹⁹. A fragmentáció történhet többek között elektronokkal, fotonokkal és gázmolekulákkal is. Utóbbi módszert, a **gázmolekulákkal történő ütköztetést ütközés indukált disszociációnak, azaz CID-nek nevezzük**, és ezt a fragmentációs módszert alkalmazzuk a leggyakrabban a „**bottom-up**” megközelítés esetén. A peptidek fragmentációja során a molekula hasadása a peptidlánc mentén történik. A fragmensionok nevezéktanát az 1. ábrán mutatom be. Amennyiben a töltés az N-terminális aminosavat tartalmazó fragmensen található meg, akkor a hasadási pozíciótól függően a, b vagy c típusú ionról beszélünk, míg a C-terminális aminosavat tartalmazó fragmensionokat x, y és z-vel jelöljük. Az alsó indexben szereplő szám arra utal, hogy a peptid hány aminosav oldalláncot tartalmaz. CID fragmentáció során jellemzően b és y típusú ionok keletkeznek²¹.



1. ábra. Peptidek fragmentációs nevezéktana²¹.

Egy másik lehetőség az **intakt fehérjék vizsgálata, amivel a „top-down” proteomika foglalkozik**. Ebben az esetben emésztőenzim alkalmazása nélkül, a mintából a fehérjék izolálását követően közvetlenül HPLC-MS/MS vizsgálatot végzünk, és azonosítjuk a fehérjéket. Ez a módszer lehetőséget teremt nagyon hasonló szerkezetű fehérjék vizsgálatára és poszt-transzlációs módosulások (PTM-ek) azonosítására is, ugyanakkor a „bottom-up” proteomikánál tisztább mintát és drágább műszereket igényel^{20,22}.

Végül használhatunk egy harmadik technikát is, ami az elmúlt években terjedt el. A **„middle-down” stratégia lényege, hogy a fehérjéket olyan speciális enzimmel hasítjuk, ami hosszú peptidek keletkezését eredményezi**. Ez technikailag a „bottom-up” eljáráshoz hasonlít, de ahhoz képest előnye, hogy a keletkező hosszabb peptidek alapján könnyebben megtörténhet a fehérjék azonosítása, valamint olyan poszt-transzlációs és szerkezeti információk is kinyerhetők belőle, ami „bottom-up” technikával nem lenne lehetséges^{8,23}. A „bottom-up”, „middle-down” és „top-down” megközelítések összehasonlítását a 2. ábrán mutatom be.



2. ábra. A „bottom-up”, „middle-down” és „top-down” proteomikai megközelítések összehasonlítása²³.

2.1.2.3. Adatfelvételi lehetőségek

A „bottom-up” proteomikában tandem tömegspektrumok felvételére két, elvükben jelentősen különböző technikát szoktak alkalmazni. A DDA („data dependent analysis”) adatfüggő mérést jelent. Ilyenkor **a számítógépes szoftver kiválasztja az MS spektrum legnagyobb intenzitású csúcsait, és azok fragmentálásával készít MS/MS spektrumokat.** A DDA mérések kiértékeléséhez számos számítógépes szoftver áll rendelkezésre, viszont a módszer hátrányai közé tartozik, hogy csak a legintenzívebb csúcsokról készül tandem tömegspektrum, így számos kis intenzitású komponens nem kerül azonosításra²⁴.

Ezzel szemben az adatfüggetlen DIA („data independent analysis”) mérések során nem egy-egy kiválasztott peptidet fragmentálunk, hanem a teljes tömegtartományt felosztjuk tömegablakokra és **sorban az adott m/z tartományba eső vegyületek kiválasztásával és fragmentálásával minden csúcsról készítünk MS/MS spektrumot.** A DIA módszer alkalmazásával így kiküszöbölhető a DDA módszer azon problémája, hogy nem minden peptidről készül tandem tömegspektrum, illetve a reprodukálhatósága is jobb a DDA-hoz képest. Ugyanakkor a módszer nehézségei közé tartozik, hogy kiértékelésének rendkívül nagy a hardver és szoftverigénye (és szoftverek korlátozottan állnak rendelkezésre), valamint a fehérjék azonosítása kevésbé megbízható, mint a DDA során²⁴.

2.1.2.4. Proteomikai mérési eredmények értékelése

A peptidek, majd a peptidekből a fehérjék azonosítása az MS/MS spektrumok alapján történik, kihasználva azt, hogy a fragmentáció jól meghatározott helyeken következik be, pl. CID aktiválás esetén tipikusan b és y típusú ionok keletkeznek. A peptid és a fehérje azonosítások leggyakrabban alkalmazott módja az adatbáziskeresés. Ilyenkor **egy adott adatbázisban szereplő fehérjékből a kereső algoritmus előállítja az összes lehetséges peptid elméleti tandem tömegspektrumát és azokat összehasonlítja a mért spektrumokkal.** Minden lehetséges peptid-spektrum pároshoz a keresőmotor hozzárendel egy, a mért és a jósolt spektrum közti egyezés mértékét jellemző pontszámot, és a legmagasabb pontszámmal rendelkező peptideket fogadja el azonosított peptidként. A peptidek azonosítása után az egyes fehérjék előfordulásának valószínűségét szintén egy pontszámmal jellemzi a keresőmotor, és egy általa meghatározott pontszám felett azonosított fehérjének tekinti őket²⁵.

Általában nemcsak a minőségi azonosítás a célunk, hanem a munkafolyamat következő lépésében a fehérjékről kvantitatív információt is szeretnénk nyerni. Ez azért szükséges, mivel egy szervezet állapotának megváltozása során gyakran nem eltűnnek vagy megjelennek egyes fehérjék, hanem a mennyiségük változik meg. **A mennyiségi meghatározás történhet**

izotópjelzésen alapuló vagy jelölésmentes módszerrel²⁶. Az **izotópjelzés** lehetséges sejtszinten (metabolikus jelölés), illetve fehérje- vagy peptidszinten (enzimatis vagy kémiai jelölés). A jelöléses technikák esetén az izotópjelzést tartalmazó peptid a teljes mintaelőkészítési és elválasztási folyamat során ugyanúgy viselkedik, mint a jelölésmentes, de a tömegspektrumban a két peptid között tömegkülönbség tapasztalható, így ezek arányából következtethetünk a peptid és fehérje abszolút mennyiségére²⁷.

A **jelölésmentes** technika esetén a mennyiségi meghatározás vagy egyszerű **spektrumszámláláson**, vagy **csúcsintenzitáson** alapul. Az előbbi esetben azt számolja meg a szoftver, hogy az adott fehérjéhez tartozó peptidekről hány MS/MS spektrum készült, míg a csúcsintenzitásos kvantitatív meghatározás esetén a peptidek kromatográfiás csúcs alatti területe alapján következtetünk a fehérje mennyiségére. A **jelölésmentes mennyiségi meghatározás egyszerűbb és olcsóbb, mint a jelöléses**, ezért nagyon elterjedt a proteomikában, ugyanakkor kisebb a pontossága és kizárólag relatív mennyiségek meghatározására alkalmas, abszolút kvantifikálásra nem²⁷.

2.2. Szilárdfázisú extrakció

A tisztítás az analitikai kémia minden területén fontos szerepet játszik. Ez különösen igaz a proteomikára, ahol egyrészt a „*bottom-up*” megközelítést követve, a fehérjék peptidekre való emésztése során különböző segédanyagokat és enzimeket alkalmazunk, ezért a minta mindenképp tartalmaz nem kívánt komponenseket, másrészt az alkalmazott detektálási módszer, a tömegspektrometria nagyon érzékeny, így a kis mennyiségű szennyező anyagokat is detektálni tudja¹⁷. Ha a szennyező komponens jobban ionizálódik, mint a mérni kívánt vegyületek, akkor könnyen elnyomhatja azok jeleit. Különösen zavarók lehetnek a szerves szennyezők, amik viaszosítják az ionok képződését, ezáltal csökkentik az érzékenységet²⁸.

A **tömegspektrometria alapú proteomikában a legelterjedtebben alkalmazott tisztítási módszer a szilárdfázisú extrakció (SPE)**. A szilárdfázisú extrakció alapja a szilárd és folyadék fázisok közti megoszlás, melyet a mintát alkotó vegyületek fizikai és kémiai tulajdonságai szabnak meg. Az elválasztás elvét tekintve a szilárdfázisú extrakció és a kromatográfia alapvetően megegyezik, de fontos különbség, hogy míg a kromatográfia során a minta összes komponense eljut a detektorba, addig az SPE során a mintát alkotó vegyületek egy részét izoláljuk, a többit viszont elveszítjük, így a minta komplexitása csökken²⁹.

Az SPE általános folyamatát négy szakaszra lehet felosztani. Az első szakasz a szilárdfázisú extrakciós állófázis aktiválása és kondicionálása. Ennek a lépésnek a célja, hogy a töltet nedvesedjen és egyensúlyi állapotba kerüljön, ezáltal pedig az SPE folyamata jobban

reprodukálhatóvá váljon. A következő lépés a minta felvitele az oszlopra. Megfelelően megválasztott SPE oszlop alkalmazása esetén a célvegyületek, „*bottom-up*” proteomikában a peptidek az állófázison fennmaradnak, míg az egyéb komponensek átesnek az oszlopon. A harmadik szakaszban az oszlopon megtapadt szennyezőket mossuk el, míg végül az utolsó szakaszban a megkötődött célkomponensek elúciója történik meg³⁰.

Általánosan a „*bottom-up*” proteomikában az emésztés során keletkező peptidkeverék tisztítása során **a célunk az, hogy a valós, tisztítás előtti és a tisztítás utáni mintaösszetétel minél jobban megegyezzen mind minőségi, mind mennyiségi szempontból.** Ilyenkor az az előnyös, ha nem mutat az alkalmazott módszer szelektivitást semmilyen paraméter, például peptidhossz, a peptid hidrofobicitása vagy a peptid sav-bázis tulajdonságai szerint, és minden komponens vesztesége is hasonló mértékű, így a mennyiségi arányok nem változnak meg az SPE hatására. A peptid hidrofobicitásának jellemzésére a GRAVY-indexet használhatjuk: minél pozitívabb ez az érték, a peptid annál inkább hidrofób jellegű, a negatívabb GRAVY-index pedig azt jelzi, hogy a peptid hidrofilebb karakterű³¹.

Egy technikailag hasonló, de célját tekintve eltérő folyamat a minta dúsítása. A dúsítás különösen fontos, ha egy adott poszt-transzlációs módosulással rendelkező peptidtípust szeretnénk vizsgálni, mivel ezek a poszt-transzlációs módosulások a természetben ritkán fordulnak elő³². Például az *N*-glikoziláció az aszparagin oldalláncának *N*-jén történhet meg, ha az aszparagin az aszparagin-X-szerin/treonin szekvenciában szerepel, ahol X egy tetszőleges aminosav lehet, kivéve prolin. Dúsítani nemcsak egy adott poszt-transzlációs módosulással rendelkező peptidtípust, pl. a glikopeptideket lehet, hanem előfordulhat például a minta dúsulása a hosszabb peptidekre nézve is. Ez azt eredményezi, hogy ha egy SPE módszer nem felel meg a torzítatlanság követelményének, akkor sem kell feltétlenül elvetnünk, mert egyes speciális célokra még alkalmas lehet.

Szilárdfázisú extrakcióhoz sokféle állófázis érhető el kereskedelmi forgalomban. Az SPE állófázis és eljárás megfelelő megválasztása alapvetően befolyásolja a proteomikai vizsgálat sikerességét. **Fehérjék és peptidek tisztítására leggyakrabban fordított fázisú elválasztást alkalmazunk.** Fordított fázisú elválasztásról akkor beszélünk, ha az alkalmazott állófázis hidrofób, a mozgófázis pedig hidrofíl. Fordított fázisú, C₁₈ és C₈ alapú tisztításokat alkalmaztak korábban például mellrákban szenvedő páciensek vérérszérum mintáinak, illetve emberi hepatocelluláris karcinóma sejtvonal lizátumok, egér zsírszövetekből származó peptidek és integrált membránfehérjék peptidjeinek tisztítására³³⁻³⁷.

Ezzel szemben, **ha jóval polárisabb, például glikozilált fehérjéket vagy peptideket szeretnénk izolálni, akkor a hidrofíl interakciós kromatográfia (HILIC) SPE alkalmazása**

lehet előnyös³⁸. A HILIC speciális változata az ERLIC, az elektrosztatikus taszításon alapuló hidrofíl interakciós kromatográfia. A fenti két módszer kombinációjával megvalósították már például mell- és agyrákos sejtekből, valamint vizeletből származó glikopeptidek tisztítását és dúsítását^{39,40}.

Egy további lehetőség a hidrofíl peptidek megkötésére a grafit állófázis, amelynek foszfopeptidek tisztítására való alkalmazhatóságát már korábban bizonyították^{41,42}. A foszforiláció, mint poszt-transzlációs módosulás, a glikozilációhoz hasonlóan jelentősen növeli a peptidek hidrofíl karakterét³². Egy másik irodalmi példában grafit alapú SPE-t alkalmaztak *N*-glikánok dúsítására emberi vészérum mintákból⁴³. Kutatócsoportunkban a grafitot tartalmazó állófázisokat elsősorban glükózaminoglikánok, GAG-ok tanulmányozása során használjuk⁴⁴.

Elterjedtek az ioncsere alapú töltetek is, amik a töltéssel rendelkező anyagok, például sók eltávolítására alkalmasak. Egy irodalmi példában kationcserélő oszlopok segítségével valósították meg *N*- és *O*-glikánok vizsgálata előtt a glikoproteinek sómentesítését⁴⁵. Egy másik publikációban patkány agyi szövetek neuropeptidjeinek tisztítására alkalmaztak kombinált C_{18} és gyenge kationcserés SPE-t⁴⁶, míg anioncserélő oszlopokat például marha eredetű standard fehérje emésztményének tisztítására és foszfopeptidekben való dúsítására használtak⁴⁷.

A következőkben azt a négy állófázist mutatom be, amikkel munkám során dolgoztam, és amelyek összehasonlításából nyert eredményeimet a dolgozatban részletesen is tárgyalni fogom.

2.2.1. A dolgozatban alkalmazott állófázisok bemutatása

A C_{18} az egyik leggyakrabban alkalmazott töltet fordított fázisú elválasztáshoz. A C_{18} oszlopon az állófázis hidrofobicitása miatt a hidrofób tulajdonságokkal bíró anyagok kötődnek meg, és kerülnek leoldásra az elúció során. A „*bottom-up*” proteomikában az emésztés során keletkező peptidek alapvetően hidrofób jellegűek, ezért a C_{18} alapú SPE alkalmas a tisztításukra²⁹. **Peptidek fordított fázisú elválasztásánál elterjedt az ionpárképző reagensek alkalmazása.** Ilyenek az illékony perfluorozott savak, például a trifluorecetsav (TFA), a pentafluoro-propionsav (PFPA) és a heptafluoro-vajsav (HFBA). Ezek a savak protonálni tudják az aminosavak bázikus oldalláncait és az *N*-terminálist, a sav anion pedig ionpárt képezhet a protonált oldalláncokkal, így a peptid-ionpár hidrofób jellege nő, ezáltal a retenció is növekszik a fordított fázisú oszlopon^{48,49}.

Minél hidrofilebb egy peptid, annál kisebb a kötődés mértéke a C₁₈ oszlopon, ezért más típusú megoldás szükséges a hidrofil peptidek tisztítására és dúsítására. A Pierce grafit egy grafitot tartalmazó, a TopTip grafit pedig egy C₁₈ töltetet és grafitot is tartalmazó kevert állófázis. **A grafit alapvetően hidrofób tulajdonságokkal rendelkezik, de a delokalizált elektronrendszer miatt a hidrofil komponensek megkötésére is alkalmas**⁵⁰.

A negyedik alkalmazott SPE állófázis egy vatta állófázis volt, amelyet pipettahegybe adott mennyiségű 100% pamutot tartalmazó vattát töltve állítottak elő kutatócsoportunkban. A vatta a cellulózszerkezet miatt HILIC állófázisként viselkedik és elsősorban a hidrofil komponensekre szelektív. A HILIC-SPE esetén az állófázis hidrofil, a mozgófázis pedig szerves oldószert és vizet tartalmaz. A hidrofil állófázis felületén egy vízben gazdag réteg alakul ki, ami visszatartja a hidrofil komponenseket²⁹. **Az eredeti publikációban, amiben a vatta szilárdfázisú extrakciós állófázisként való alkalmazhatóságát elemezték, a módszert N-glikopeptidek és N-glikánok tisztítására használták**⁵¹, kutatócsoportunkban pedig a vatta GAG diszacharidok tisztítására való alkalmazhatóságát is részletesen vizsgálták.

Az alkalmazott állófázisok típusát, elválasztási mechanizmusát és egy-egy konkrét példát az 1. táblázatban foglaltam össze.

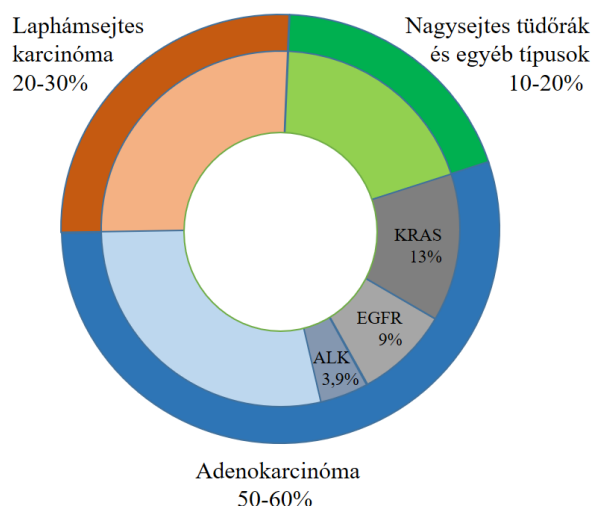
1. táblázat. Az alkalmazott SPE állófázisok, elválasztási mechanizmusuk és alkalmazási példáik.

Állófázis típusa	Elválasztás mechanizmusa	Példa
C ₁₈	fordított fázis	hepatocelluláris karcinóma sejtvonal lizátum tisztítása ³³
grafit	összetett mechanizmus	N-glikánok dúsítása emberi vérsérum mintából ⁴³
vatta	HILIC	triptikus immunoglobulin N-glikopeptidek tisztítása ⁵¹

2.3. ALK génátrendeződést mutató tüdőrák

2.3.1. Nem kissejtes tüdőrák és annak célzott terápiás kezelési lehetőségei

Napjainkban a tüdőrák felelős a legtöbb rákos megbetegedés okozta halálesetért, becslések szerint 2021-ben világszerte több mint 1,8 millió haláleset következett be a tüdőrák miatt⁴. A tüdőrák leggyakoribb formája a nem kissejtes tüdőrák (non-small cell lung cancer, NSCLC), ami körülbelül az összes tüdőrákos megbetegedés 80-85%-áért felelős⁴. **A kis- és nem kissejtes felosztás azért fontos, mivel ez határozza meg, hogy a tumor várhatóan milyen típusú kezelésre fog reagálni.** A kissejtes tüdőrák műtéti úton nem távolítható el, de a kemo- és sugárterápiára reagál⁵². Ezzel szemben a nem kissejtes változat műtéti úton, ha eltávolítható, jobban kezelhető⁵³. **A nem kissejtes tüdőrák körülbelül 60%-ban adenokarcinóma**, minden harmadik esetben pedig laphámsejtes karcinóma típusú, valamint ritkábban előfordul nagysejtes kevert vagy ún. neuroendokrin elváltozás is^{4,54}. Az adenokarcinóma esetén a leggyakoribb, a betegség kialakulásáért felelős genetikai eltérések közé tartozik a KRAS, az EGFR, az ALK, a RET, a ROS1, a BRAF, a HER2 és a MET gének rendellenessége, melyek laphámsejtes karcinómában ritkán fordulnak elő⁴. A nem kissejtes tüdőrák különböző típusainak és az adenokarcinómában három leggyakoribb génátrendeződésnek előfordulási gyakoriságát a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra. A nem kissejtes tüdőrák különböző típusainak, és az adenokarcinóma háttérében álló három leggyakoribb génátrendeződésnek előfordulási gyakorisága⁴.

Amennyiben az NSCLC-pozitív betegnél az adenokarcinóma kialakulásáért egy gén átrendeződése tehető felelőssé, akkor **lehetőség van molekuláris célzott terápiás kezelést alkalmazni**, melyek az utóbbi évtizedekben jelentek meg és terjedtek el. Ezek a célzott terápiák azt használják ki, hogy a rákos sejtek genetikai állománya eltér a körülöttük lévő egészséges

sejtektől, így lehetséges olyan folyamatokba beavatkozni, ami csak a rákos sejtekben játszódik le, az egészségesekben nem, vagy korlátozottan. A célzott terápiás gyógykezelések jelentősen javítják a betegek gyógyulási esélyeit, azonban rendkívül költségesek és több mellékhatást okoznak, mint a hagyományos terápia⁴.

Célzott terápia alkalmazható többek között az EGFR (epidermális növekedési faktor receptor) génmutációja esetén. Amennyiben ez a mutáció okozza az NSCLC-t, akkor a beteg nagyobb eséllyel reagál az EGFR tirozin kináz inhibitor gyógyszerekre. Ilyen gyógyszerek a gefitinib és az erlotinib⁵⁵. A célzott terápiás gyógyszerek egy másik gyakori célpontja az ALK génátrendeződés. **Az ALK génátrendeződés kezelésére számos ALK inhibitor terápiás gyógyszer áll rendelkezésre:** ezek a crizotinib, a ceritinib, az alectinib és a brigatinib. Ezek a gyógyszerek olyan tirozin kináz inhibitorok, amik az átrendeződött ALK gén által kódolt fehérje aktivitását gátolják, ezáltal pedig képesek lehetnek megakadályozni a tumoros sejtek növekedését és szaporodását³. Ezenkívül már elérhetők RET, BRAF, ROS1, NTRK, MET és KRAS génmutáció kezelésére is célzott terápiák. A célzott szerek alkalmazásával a betegségmentes és teljes túlélésben is sosem látott előnyhöz jutottak a betegek, azonban a végleges gyógyulás csak kivételes esetben fordul elő⁴.

A célzott terápia egy további formája az immunterápia. A napjainkban alkalmazott immunterápiás gyógyszerek a programozott sejthalál receptor-1 (PD-1) és liganduma (PD-L1) közti kölcsönhatást akadályozzák meg úgy, hogy vagy a PD-L1, vagy a PD-1 fehérjéhez kapcsolódnak antitestként. Alapesetben a PD-L1 fehérje az egészséges sejtek felszínén található meg, és azáltal, hogy a rákos sejtek ellen védekező T-sejteken lévő PD-1 fehérjét felismeri és hozzájuk kötődik, segít abban, hogy a T-sejtek ne pusztíthassák el az egészséges sejteket⁵⁶. Azonban a PD-L1 fehérje egyes tumorsejtek felszínén is nagy mennyiségben van jelen, így segít a rákos sejteknek, hogy a T-sejt ne tudja őket elpusztítani. Amennyiben a tüdőrákos beteg tumoros sejtjein sok PD-L1 fehérje van, akkor érdemes ilyen, immunterápia alapú célzott kezelést alkalmazni⁵⁵.

2.3.2. ALK génátrendeződéssel járó NSCLC azonosítása

Az ALK gén az anaplasztikus limfóma kináz fehérjét kódoló DNS-szekvencia. Ez az ALK fehérje a tirozin kináz fehérjék családjába tartozik és a fehérjecsalád többi tagjával együtt a sejtnövekedésért felelős. A nem kissejtes tüdőrákban szenvedők körülbelül 4%-ában van jelen az ALK gén elváltozása a kettes kromoszómán, ami az ALK gén fúziójához vezet egy másik génnel. A leggyakoribb ALK fúziós partner az EML4 nevű gén: a két gén fúziója az EML4-ALK fúziós fehérje termelését eredményezi az ALK fehérje helyett⁵⁷.

Az ALK génátrendeződés vizsgálata történhet gén vagy fehérje szinten: előbbi esetben az ALK gén átrendeződését, utóbbi esetben pedig a megváltozott ALK fehérjét mutatjuk ki. **A génelterés génszintű kimutatására a leggyakrabban alkalmazott és standardnak tekintett megoldás az ún. fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) módszer⁵⁸.** Ebben az esetben egy fluoreszcensen jelölt oligonukleotidot alkalmaznak, ami a kimutatni kívánt DNS szakasszal hibridizációt mutat. A vizsgálandó kromoszómákat ilyenkor egy szubsztráton rögzítik, denaturálják, majd hozzáadják a jelölt oligonukleotid szálát. Az oligonukleotid a komplementer DNS szállal hibridizál, és fluoreszcens mikroszkóp alá téve láthatóvá válik, hogy hol kötődött meg az oligonukleotid szál⁵⁹.

Egy másik, a mutáció fehérjeszintű azonosítására alkalmas technika az immunhisztokémia (IHC). Ez a módszer a megváltozott, fúziós ALK fehérje kimutatását célozza meg. Elve, hogy a vizsgált sejt vagy szövet fixálását követően az antigén fehérjéhez hozzáadják a neki megfelelő primer antitestet, majd a nem kötődött antitest kimosása után egy fluorofórral jelölt, a primer antitesthez kötődő szekunder antitestet. Amennyiben a minta tartalmazta a keresett antigén fehérjét, akkor fluoreszcens mikroszkóp alatt fényjelenséget produkál. A FISH után ez a második legelterjedtebb módszer az ALK gén átrendeződésének kimutatására⁶⁰. Az említett két technika mellett vannak egyéb, ritkábban alkalmazott módszerek is, pl. ismert fúziós fehérje kimutatására alkalmas a polimeráz láncreakció (PCR) is.

Az ALK génátrendeződést mutató tüdőtumoros szövetek és általánosan a szövetek vizsgálata történhet proteomikai technikák alkalmazásával is. A tömegspektrometria alapú proteomika kiválóan alkalmas ezen szövetek proteomikai vizsgálatára és jellemzésére, ezért munkám során én is ezt a megközelítést használtam a tüdőmetszetek vizsgálatára. A szövetek vizsgálatának egyik módja a metszet homogenizálása egyetlen mintává. Ennek hátránya, hogy a térbeli eloszlásra vonatkozó információk elvesznek. Ennek kiküszöbölésére **csoportunkban a szövetek emésztését közvetlenül a szövetfelületen végezzük**, ami lehetőséget teremt egy-egy szövetről több, kisebb régió vizsgálatára⁶¹.

2.3.3. Tumorok besorolása és heterogenitása

Egy-egy tumoros szövetminta általában nem homogén, hanem lehetséges a metszeten több, eltérő morfológiai megjelenésű és funkciójú komponens megkülönböztetése.

Szövetek patológiai jellemzése mikroszkóp segítségével történhet, a sejtek kinézete és egymáshoz viszonyított elhelyezkedése alapján. A vizsgálataimhoz használt metszetek háromféle, patológiai szempontból eltérő tumoros régiót tartalmaztak.

A **papilláris tumor** olyan daganat, amely **szövettani szerkezete sokszor kesztyűujj alakú** elrendeződést mutat. A papilláris adenokarcinómában összetett, elágazó nyúlványok, *ún.* papillák figyelhetők meg, melyek fibrovaszkuláris magjait tumorsejtek bélelik⁶².

A **tubuláris tumor** sok kötőszövetes elemet tartalmazó daganat. Ezek a tumorok jellemzően kicsik, általában 1 cm-nél kisebb átmérővel rendelkeznek. Nevüket a mikroszkóp alatt megfigyelhető, **cső-szerű alakjukról** kapták⁶³.

A **szolid tumor** olyan rákos szövet, ami nem tartalmaz cisztákat és egyéb folyadékokat. Mind az adenokarcinómában, mind általánosan a daganatokat tekintve a szolid tumor a leggyakoribb típus.

A sejtek alakja alapján történő patológiai besorolás mellett egy másik lehetőség az egyes komponensek mennyisége szerinti csoportosítás.

A **mucinok** nagy molekulatömegű, **erősen glikozilált fehérjék**, melyek a gélképző képességükről ismertek⁶⁴. A mucinok elsősorban a sejtfelszínen fordulnak elő, és fontos szerepet töltenek be a sejtek közti jelátvitel folyamatában. A mucin fehérjecsald, különösen a MUC1 fehérje felül-expresszióját több ráktípusban is megfigyelték⁶⁵. A mucinokban gazdag tumoros régiót mucinózusnak nevezzük. A mucinózus karcinóma sejtei váladékot termelnek⁶⁴.

Általánosan a **stroma** a szerv felszíne alatt található szövet, mely a szerv meghatározott funkcióival nem rendelkezik. A stroma feladata a szerv többi részének összetartása, alakjának rögzítése. A stroma elsősorban fibroblaszt sejtekből áll, melyek jellegzetes orsó alakkal rendelkeznek és a merevítésért, illetve a hajlékonyság biztosításáért felelősek. **Tumor stroma alatt** ennek mintájára **azokat a szerkezeti komponenseket értjük, melyek a tumoros sejteket, szöveteket tartják össze**⁶⁶.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált anyagok

- Acetonitril: Sigma-Aldrich, LC-MS Chromasolv®
- Ammónium-hidrogénkarbonát: Sigma-Aldrich
- Citromsav (vízmentes): Sigma-Aldrich
- Ditiotritol (DTT): Sigma-Aldrich
- Ecetsav (99%): Fluka
- Etanol: VWR
- Glicerín (>99,5%): Sigma-Aldrich
- Hangyasav (FA): Sigma-Aldrich
- Heptafluoro-vajsav (HFBA, >99,5%): Sigma-Aldrich
- Jódacetamid: Sigma-Aldrich
- LC-MS víz: Sigma-Aldrich
- Metanol: Sigma-Aldrich, Chromasolv® for gradient elution
- Na-citrát: Sigma-Aldrich
- Pierce™ C₁₈ SPE oszlopok: Thermo Fisher Scientific
- Pierce™ grafit SPE oszlopok: Thermo Fisher Scientific
- Pierce™ HeLa standard fehérje emésztmény: Thermo Fisher Scientific
- Tripszin Gold, Mass Spectrometry Grade: Promega
- Tripszin/Lys-C Mix, Mass Spec Grade: Promega
- Rapigest™: Waters Inc.
- TopTip C₁₈+grafit SPE oszlopok: Glygen Corporation
- Trifluorecetsav (TFA): Sigma-Aldrich
- Xilol: VWR

3.2. SPE módszerek vizsgálata

3.2.1. Minták előkészítése

Az SPE módszerek optimalizálásához két mintát használtam: az egyik a kereskedelmi forgalomban kapható HeLa emésztmény volt, ami készen rendelkezésünkre állt. A másik anyag egy depletált és frakcionált vérplazma minta⁶⁷ volt, amely az izolálási lépések (depletálás, frakcionálás) miatt kevésbé összetett, mint a HeLa. A vérplazma mintát oldatfázisú emésztésnek vettem alá. Ennek során a mintát Rapigest oldattal denaturáltam, a S-S hidakat DTT-vel felszakítottam és jódacetamiddal alkiláltam, majd a fehérjéket előbb Lys-C és tripszin

keverékével, végül tripszinnel emésztettem peptidekké. Az enzimatis emésztést hangyasav hozzáadásával állítottam meg.

A részletes emésztési folyamat a következő volt: egy plazma frakcióhoz (30 µg) 30 µL LC-MS víz + 5% MeOH oldószert, valamint 5 µL 0,5% Rapigest-et és 2 µL 200 mM DTT-t adtam. Az oldatot 60 °C-on 30 percig inkubáltam. Miután visszahűlt szobahőmérsékletre, 5 µL 200 mM NH_4HCO_3 (pH = 7,8) oldatot és 2,5 µL 200 mM jódetamidot adtam hozzá és 30 percig szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltam. Az emésztést 0,5 µL Lys-C/tripszin keverékkel (20 µg/80 µL H_2O) végeztem 1 óráig 37 °C-on, majd 1 µL tripszin (40 pmol/µL) enzimmel 2 óráig 37 °C-on. Ezután 1,5 µL hangyasavat adtam hozzá és 37 °C-on 30 percig inkubáltam, majd 13500 rpm fordulatszámon centrifugáltam 30 percig. Végül az oldatot megfelelő méretű porciókra osztottam és fűtött vákuumcentrifugában bepároltam.

3.2.2. Szilárdfázisú extrakciós tisztítási módszerek

A HeLa és a vérplazma frakció tisztításához alkalmazott SPE eljárások lépéseit a 2. táblázatban foglaltam össze. A tisztításhoz a Pierce és TopTip eljárások, valamint a gyártói C_{18} esetén a gyártó által javasolt munkafolyamatot használtam, míg a C_{18} -hoz a kutatócsoportunkban korábban optimált, a saját töltésű vatta állófázis esetén pedig az irodalomban leírt protokollt alkalmaztam. Minden esetben az elúciós lépést követően a mintát bepároltam és a mérés megkezdéséig fagyasztóban tároltam.

A HPLC-MS/MS mérésekhez a HeLa és vérplazma mintákat 10 µL injektálási oldószerben (98% H_2O , 2% ACN, 0,1% FA) oldottam vissza, melyből a HeLa esetén 5 µL, a vérplazma esetén 6 µL került injektálásra.

2. táblázat. Az alkalmazott szilárdfázisú extrakciós eljárások bemutatása.

Módszer neve	(optimált) C ₁₈	TopTip, Pierce	Vatta	gyártói C ₁₈
Állófázis típusa	Pierce C ₁₈	TopTip grafit, Pierce grafit	Saját töltésű vatta	Pierce C ₁₈
Eljárás menete	Minden lépés után centrifugálás: 2000 rpm-n 1 percig.*	Minden lépés után centrifugálás: 2500 rpm-n 1 percig.	Minden lépés után centrifugálás: 2500 rpm-n 1 percig.	Minden lépés után centrifugálás: 1500 rpm-n 1 percig.
Aktiválás és kondicionálás	2 x 200 µL 50% MeOH	2 x 100 µL 0,1% TFA + 80% ACN	50 µL 60% ACN	2 x 200 µL 50% MeOH
	2 x 200 µL 0,5% TFA + 5% ACN		2 x 50 µL 1% TFA, 98% ACN	2 x 200 µL 0,5% TFA + 5% ACN
Mosás	2 x 200 µL 0,1% HFBA	2 x 100 µL víz		2 x 200 µL 0,1% TFA
	Eppendorf-cső tisztára cserélése.			
Mintafelvétel	50 µL 0,1% HFBA oldatban. Az átfolyt oldat újbóli felvitele az oszlopra.	50 µL vízben. Centrifugálás előtt 2 perc inkubálás. Az átfolyt oldat újbóli felvitele az oszlopra.	30 µL 1% TFA, 95% ACN oldatban. Az átfolyt oldat újbóli felvitele az oszlopra x 2	50 µL 0,1% TFA oldatban. Az átfolyt oldat újbóli felvitele az oszlopra.
Mosás	2 x 100 µL 0,1% HFBA	3 x 50 µL víz	50 µL 1% TFA, 95% ACN	2 x 100 µL 0,1% TFA
	Eppendorf-cső tisztára cserélése.			
Elúció	2 x 50 µL 0,1% TFA + 70% ACN	3 x 50 µL 0,05% TFA + 40% ACN	10 µL 0,1% FA – 40 °C-ra termosztálva	2 x 50 µL 0,1% TFA + 70% ACN
	1 x 50 µL 0,1% FA + 70% ACN. Centrifugálás előtt felkavarás és 1 perc inkubálás.			

*: Előző nap hűtőbe tenni: C₁₈ SPE oszlopokat + a kondicionáló, ekvibráló és mosó puffereket. Minden oldatot csak közvetlenül az oszlopra pipettázás előtt veszünk ki a hűtőből, beleértve a mintát is, kivéve az elúciós oldatokat.

3.3. ALK génátrendeződést mutató tüdőszövetek vizsgálata

A tüdőminták sebészi vagy bronchológiai vizsgálat során lettek eltávolítva a betegekből rutin eljárás során. A szövetmintákat az Országos Korányi Pulmonológiai Intézet Patológiai Osztályán vizsgálták és tárolták, további tudományos feldolgozáshoz intézményi és ETT engedélyeztetés készült (2521-0/2010-1018EKU, 510/2013, 52614-4-213EKU). A patológiai mintákból a helyszínen lemetzésre került a vizsgálatainkhoz célzottan megfelelő mennyiségű, két, egyenként 6 µm vastag szövet SuperFrost tárgylemezre.

Összesen 7 szövetmetszettel dolgoztam, melyekről 23 régióban végeztem szövetfelületi proteomikai emésztést. A vizsgált régiók átlagosan 0,3 cm² nagyságúak voltak. A metszetek hematoxin-eozin (H&E) festett képe és a minták számozása a *Függelék 1. ábráján*, a minták patológia, mucintartalom és stromatartalom szerinti jellemzése a *Függelék 1. táblázatában* szerepel. A 23 vizsgált proteomikai szöveti régió közül egy a tüdőszövet melletti zsírszövetből származott, ezért azt az egyedi foltok kiértékelése során nem használtam fel, azonban a normál tüdőszöveti „pool” mintában szerepel.

3.3.1. Szövetminták előkészítése

A kapott metszetek formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetmetszetek voltak. A formalin-fixálás és a paraffinba ágyazás célja a minta tartósítása volt. Ahhoz, hogy a szövetmetszetek készen álljanak a „bottom-up” proteomikai emésztésre, először a szövetmintákat 2 órán keresztül 60 °C-on hőkezelttem a szövetek tárgylemezen való rögzítése céljából, majd deparaffineztem. A deparaffinezés célja, hogy a tartósítás során a szövetbe behatolt paraffint eltávolítsuk⁶⁸. Ezt xilollal, etanollal és vízzel történő mosással valósítottam meg. A deparaffinezési folyamatot egy, a kutatócsoportunkban korábban optimált eljárás szerint végeztem, melynek pontos lépéseit és az alkalmazott inkubálási időket a 3. táblázatban tüntettem fel.

3. táblázat. A deparaffinezési folyamat lépései.

Alkalmazott oldat	Inkubálási idő
xilol	5 perc
xilol	5 perc
100% etanol	3 perc
100% etanol	3 perc
90% etanol + 10% H ₂ O	3 perc
70% etanol + 30% H ₂ O	3 perc
10 mM NH ₄ HCO ₃ vizes oldat	5 perc
100% H ₂ O	1 perc

Munkám következő lépése az antigén-előhívás volt. Az antigén-előhívás során magas, 80-85 °C közti hőmérsékleten Na-citrátot és citromsavat tartalmazó, pH = 6-os pufferben hőkezelték a mintákat 30 percen keresztül. Az antigén-előhívás elősegíti a fehérjék emésztését és kivonását a felületről⁶⁹. A deparaffinezést és az antigén előhívást követően a minták készen álltak a proteomikai emésztésre.

3.3.2. Szövetfelületi emésztés

A szövetfelületi emésztési eljárás lépései megegyeztek az oldatban történő emésztés folyamatával^{61,70}. A szövetfelületi emésztés során alkalmazott oldatok glicerint tartalmaztak, hogy visszaszorítsuk a folyadékcseppek elterülését. Az emésztéshez szükséges enzimeket több lépésben, 40 perces ciklusokban adtam hozzá a mintához, hogy folyamatosan rendelkezésre álljon kellő koncentrációban aktív enzim.

A részletes szövetfelületi emésztési folyamat a következő volt: A kijelölt pontokra 2 µL 0,1% RapiGest + 5 mM DTT + 20% glicerín keverékét cseppentettem és nedvesített dobozban 55 °C-on inkubáltam 20 percig. A cseppekhez 2 µL 25 mM NH₄HCO₃ + 10 mM jódiacetamid + 20% glicerín oldatot adtam és szobahőmérsékleten, sötétben tartottam 20 percig. Az emésztést előbb két ciklusban 2-2 µL Lys-C/tripszin keverékkel (40 ng/µL 50 mM NH₄HCO₃ és 15% glicerín keverékében), majd 3 ciklusban 2-2 µL tripszin oldattal (200 ng/µL 50 mM NH₄HCO₃ és 15% glicerín keverékében) végeztem. Minden ciklus során nedvesített dobozban 37 °C-on inkubáltam 40 percig. Végül a folyadékcseppet lepipettáztam a szövetfelületről és a felületen visszamaradó peptideket 5 x 2 µL 10% ecetsav oldattal, többszöri fel-le pipettázással nyertem ki. A cseppet és az extrakcióhoz használt oldatot egy Eppendorf-csőbe gyűjtöttem, majd bepároltam.

3.3.3. Szilárdfázisú extrakciós tisztítás

A szilárdfázisú extrakciós tisztításhoz a 4.1. *Szilárdfázisú extrakciós módszerek összehasonlítása* c. fejezetben szereplő eredmények alapján az optimált C₁₈ eljárást választottam. Ehhez a C₁₈ SPE oszlopokat, a kondicionáló, ekvilibráló és mosó puffereket, valamint a mintát is hűtőben tároltam, és csak közvetlenül a felhasználás előtt vettem elő. Minden lépés után 2000 rpm fordulatszámon 1 percig centrifugáltam. A kondicionáláshoz 2 x 200 µL 50% MeOH-t, majd 2 x 200 µL 0,5% TFA + 5% ACN-t használtam. Az oszlop mosását 2 x 200 µL 0,1% HFBA oldattal végeztem. Az Eppendorf-cső tisztára cserélése után a mintát 50 µL 0,1% HFBA oldatban vittem fel, majd az átfolyt oldatot újból az oszlop

pipettáztam. Az oszlopot 2 x 100 μ L 0,1% HFBA-val mostam, végül pedig 2 x 50 μ L 0,1% TFA + 70% ACN oldattal, majd 50 μ L 0,1% FA + 70% ACN oldattal végeztem az elúciót. Az utolsó elúciós lépés előtt az oldatot felkavartam és 1 percig inkubáltam. Az elúciós oldatot bepároltam és a mintát a mérésig fagyaszttóban tároltam.

A mintákat mérés előtt 8 μ L injektálási oldószerben oldottam fel, amiből 6 μ L került injektálásra.

3.4. Műszeres analitikai vizsgálatok

Az alkalmazott mérőműszer két részből állt: egy Dionex Ultimate 3000 RSLC nanoUHPLC (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) és egy Bruker Maxis II Q-TOF tömegspektrométer (Bruker, Bremen, Germany).

3.4.1. HPLC elválasztás paraméterei

Áramlási sebesség: 0,3 μ L/min.

Csapdázó oszlop: 100 μ m x 20 mm Nano Trap kolonna Acclaim PepMap100 C₁₈ töltettel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Analitikai kolonna: Acquity M-Class BEH130 C₁₈ analitikai kapilláris kolonna; 1,7 μ m, 75 μ m x 250 mm (Waters, Milford, MA).

Mintafelviteli eluens: 0,1% TFA vizes oldat.

A eluens: 0,1% FA vizes oldat.

B eluens: 0,1% FA acetonitriles oldat.

A HeLa és a tüdőminták peptidjeinek elválasztása 90 perces HPLC gradienssel történt, míg a vérplazma frakció vizsgálatához a minta kevésbé komplex jellege miatt 60 perces gradienst használtam.

90 perces gradiens program: 4% B → 25% B 75 perc alatt, 25 % B → 40% B 15 perc alatt, 40% B → 90% B 1 perc alatt, 5 perc mosás, 90% B → 4% B 1 perc alatt, 20 perc ekvilibrálás.

60 perces gradiens program: 4% B → 25% B 50 perc alatt, 25 % B → 40% B 10 perc alatt, 40% B → 90% B 1 perc alatt, 5 perc mosás, 90% B → 4% B 1 perc alatt, 15 perc ekvilibrálás.

3.4.2. MS módszer paraméterei

Az ionforrás egy CaptiveSpray nanoBooster volt, melyet pozitív ionizációs módban alkalmaztunk. A kapillárisfeszültség 1150 V, a nanoBooster gáznyomása 0,2 bar volt. A 180 °C-ra fűtött szárítógázt 3 L/perc sebességgel áramoltattuk. A tömegkalibrációhoz az

Agilent Technologies cégtől vásárolt alacsony koncentrációjú kalibráló keveréket használtuk, valamint minden futás elején belső tömegkalibrációt végeztünk nátrium-formiát injektálásával.

Az MS és MS/MS spektrumok felvétele 2,5 másodperces ciklusidővel történt a 150-2200 m/z tömegtartományban. A normál MS spektrumokat 3 Hz gyakorisággal vettük fel. A nagy intenzitású prekursorokból származó fragmensionokról 16 Hz, míg a kis intenzitású prekursorokból származó fragmensionokról 4 Hz gyakorisággal készült MS/MS spektrum.

Az analízishez csak a többszörös töltésű peptideket használtuk, az egyszeres töltésű peptideket nem fragmentáltuk. Az ütközési energiát a vezérlő szoftver határozta meg a prekursor ion m/z értéke és töltése alapján.

3.5. Mérési eredmények értékelése

A mérési eredmények értékelése számítógépes programok használatával történt. A mintában található fehérjék azonosításához a Byonic⁷¹ 4.2.10 keresőszoftvert alkalmaztam, ami az MS/MS spektrumok alapján azonosítja a peptideket, majd meghatározza, hogy az azonosított peptidek milyen fehérjéből származhatnak. A HeLa minták esetén a kutatócsoportunkban korábban összeállított, emberi fehérjéket tartalmazó HeLa adatbázist, míg a vérplazma és a szövetminták esetén a Swissprot humán adatbázist (letöltés dátuma: 2020.11.24) használtam. Az emésztési protokollnak megfelelően fix módosulásként a cisztein aminosavak karbamidometilálását állítottam be, változó módosulásnak pedig az aszparagin és a glutamin deamidálását és a metionin oxidációját. A prekursor ionok esetén 5 ppm, a fragmensionok esetén 10 ppm eltérést engedtem meg az elméleti és a mért tömeg között. A keresés során legfeljebb 2 kihagyott hasítási helyet engedélyeztem.

A Byonic által azonosított peptid- és fehérjetalálatokat tovább szűrtem. Azokat a fehérjéket fogadtam el valós találatként, amelyek legalább 2 megbízhatóan azonosított egyedi peptiddel rendelkeznek, és a fehérjéhez tartozó LogProb érték (a Byonic szoftver esetén a találat megbízhatóságát jellemző pontszám) legalább 2 volt. Megbízható peptidtalálatnak azokat a peptideket tekintettem, amiknél a LogProb legalább 1,3 volt. A találatok szűrését a ProteinSearcher nevű, kutatócsoportunkban fejlesztett szoftverrel végeztem.

A peptidek hidrofobicitásának jellemzésére szolgáló GRAVY-index kiszámítását egy Excel-függvénnyel végeztem, míg az izoelektromos pont meghatározásához az ExPASy internetes izoelektromos pont kalkulátorát⁷² használtam.

Annak meghatározására, hogy a különböző csoportok között a peptid- és fehérjetalálatok mennyire egyeznek meg, a Scaffold⁷³ 4.11 szoftvert használtam. A Scaffold lehetővé teszi a különböző mérésekből, méréscsoportokból azonosított fehérjék

összehasonlítását, valamint azok biológiai funkció vagy elhelyezkedés szerinti osztályozását. A kapott diagramok és táblázatok segítik a nagyszámú mérési adat átláthatóságát és a mérési eredmények értelmezését.

A fehérjék mennyiségi meghatározásához a MaxQuant 1.6.17.0 szoftvert⁷⁴ használtam, a Byonic szoftverrel történt azonosítások alapján készült fókuszált adatbázis felhasználásával, a *Függelék 2. táblázatában* feltüntetett beállítások mellett. A mennyiségi meghatározás belső standard nélkül, jelölésmentes elven történt. A szövetmintákra kapott MaxQuant eredmények statisztikai értékeléséhez és vizualizálásához a Perseus⁷⁵ szoftvert használtam. Az értékelés menetét és az alkalmazott beállításokat a *Függelék 3. táblázatában* tüntettem fel.

A fehérjetalálatok interakcióinak feltérképezését a STRING GO webszerver⁷⁶ segítségével végeztem. Interakciónak a kísérleti eredményt, az adatbázist, a ko-expressziót, a génszomszédságot és a génfüziót tekintettem. A találatok közül azokat a kapcsolatokat fogadtam el, melyekhez magas, legalább 0,7-es megbízhatósági pontszám tartozott.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Szilárdfázisú extrakciós módszerek összehasonlítása

Az optimális tisztítási módszer kiválasztásához célul tűztem ki, hogy a laborunkban alkalmazott SPE állófázisokat és módszereket megvizsgáljam és teljesítőképességüket összehasonlítsam. A vizsgálataimhoz egy szokványos hidrofobicitás-eloszlású proteomikai mintát, a kereskedelmi forgalomban kapható HeLa méhnyakrákos sejtvonal emésztményt és egy frakcionált vérplazma minta emésztményét választottam. A tisztításhoz négyféle állófázist (C_{18} , Pierce grafit, TopTip grafit, vatta) használtam, melyeket a 2.2.1. *A dolgozatban alkalmazott állófázisok bemutatása* c. fejezetben mutattam be részletesen.

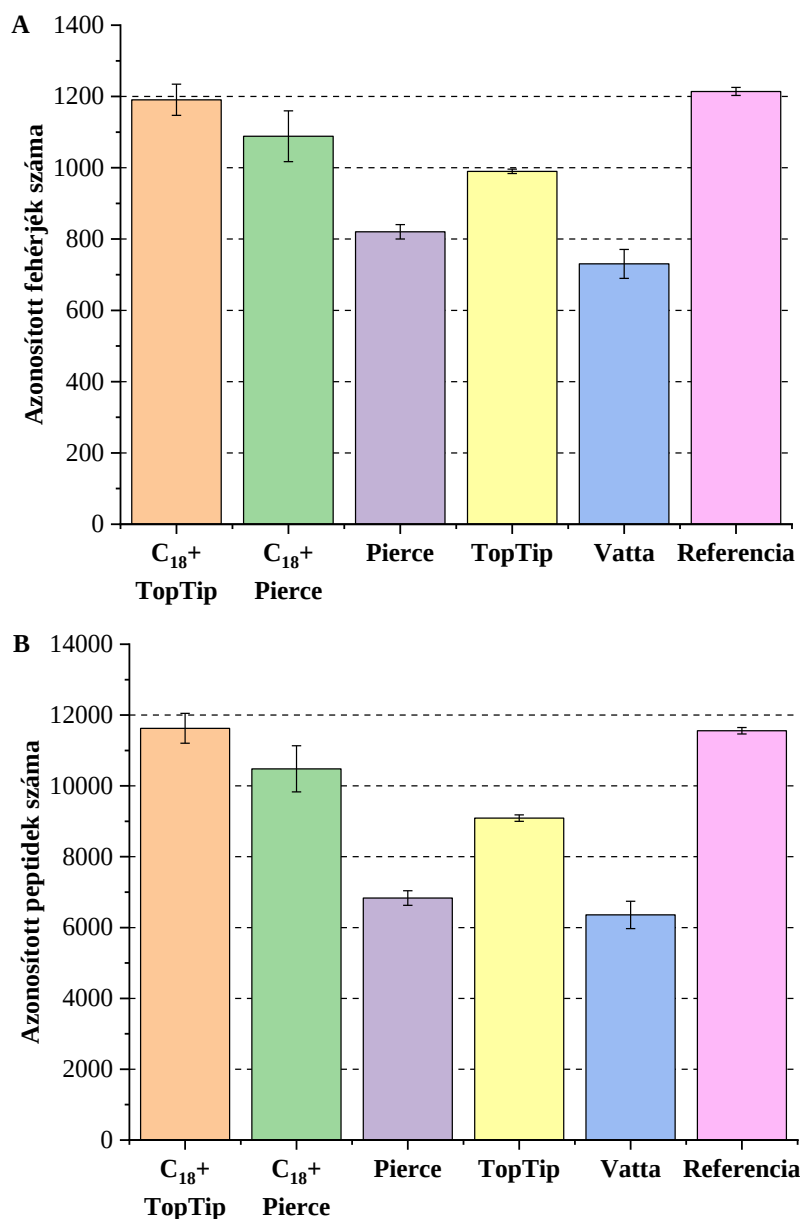
4.1.1. SPE módszerek összehasonlítása szokványos hidrofobicitás-eloszlású proteomikai minták tisztítása esetén

Első lépésben a vizsgálatokat a kereskedelmi forgalomban kapható standard HeLa méhnyakrákos sejtvonal emésztménnyel végeztem, ami egy jól ismert, szokványos hidrofobicitás-eloszlású minta. Ez a minta meglehetősen tiszta, ezért általában külön tisztítás nélkül, közvetlenül injektálhatjuk a HPLC-MS készülékbe. Mindazonáltal a különböző tisztítási eljárásoknál bekövetkező veszteségek modellezésére a HeLa kiválóan alkalmas.

A sorozat első lépéseként 5 különböző SPE tisztítást (C_{18} +TopTip, C_{18} +Pierce, TopTip, Pierce, vatta) végeztem 3-3 párhuzamos mintán, valamint 3 referenciamintát készítettem. A kombinált módszereket úgy valósítottam meg, hogy az első oszlopon áteső és a mosási lépésben leoldott komponenseket tisztítottam tovább a második eljárással. A referenciamintát a TopTip és Pierce módszerekhez használt elúciós oldószerben oldottam fel, majd bepároltam. Minden minta 1-1 μ g HeLa emésztményt tartalmazott. A HPLC-MS/MS mérés során azonosított fehérjék és peptidek számának alakulása a 4. ábrán látható.

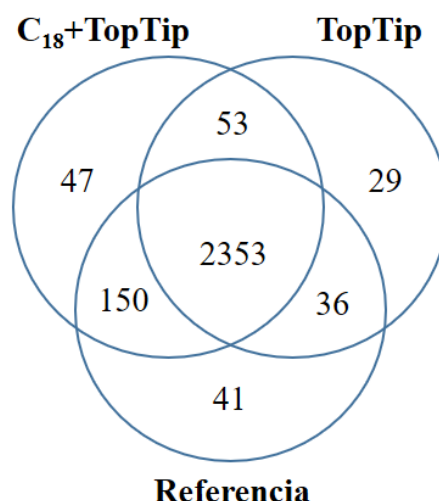
A kvalitatív eredmények alapján a C_{18} +TopTip módszer bizonyult az öt SPE tisztítás közül a legjobbnak, ahol az azonosított fehérjék száma 98%-a a referenciában (1 μ g HeLa oldása és bepárlása) azonosított fehérjéknek, de a C_{18} +Pierce és a TopTip alkalmazásával is jó eredmény volt elérhető, mindkét esetben a referenciában lévő fehérjék számának több, mint 80%-a volt azonosítható. Peptidszinten ugyanez a tendencia volt megfigyelhető: a legjobb, C_{18} +TopTip eljárással a referenciában észlelt peptidek számának 100,5%-át, a C_{18} +Pierce módszerrel a 91%-át, a TopTip módszerrel a 79%-át azonosítottuk. A 100%-nál nagyobb peptidszám magyarázata az lehet, hogy egyes peptidek mennyisége a mintában a kimutatási határ alatt volt, a tisztítást követően viszont feldúsultak annyira, hogy kimutathatóvá váljanak.

A Pierce és a vatta eljárások a többi módszernél kevesebb peptid- és fehérje azonosítását tették lehetővé.



4. ábra. HeLa-ból azonosított fehérjék és peptidok száma öt különböző SPE tisztítás és a referencia esetén.

A Scaffold program alkalmazásával megállapítottam, hogy **az azonosított fehérjék nagyon nagy részben átfednek a különböző SPE módszerek között.** Példaként álljon itt a C₁₈+TopTip és TopTip eljárás, valamint a tisztítatlan kontroll minta (1 µg HeLa oldása és bepárlása) esetén azonosított fehérjék Venn-diagrammal történő összehasonlítása.

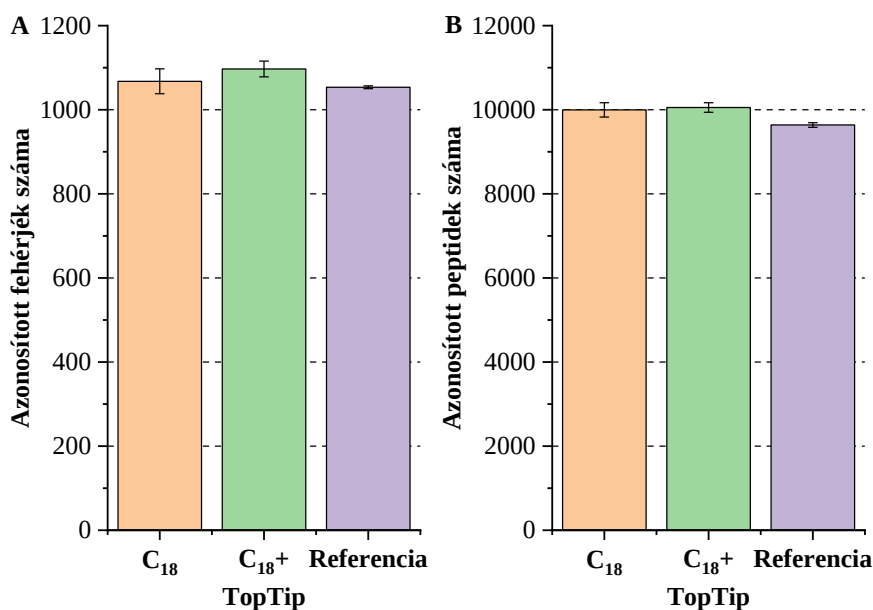


5. ábra. *TopTip grafit tisztítás és C₁₈+TopTip grafit kombinált tisztítás azonosítási hatékonyságának összehasonlítása a két módszerrel előkészített mintákban és referenciában azonosítható fehérjék száma alapján.*

Az azonosított peptidek és fehérjék számát tekintve az öt SPE módszer közül a C₁₈+TopTip volt a legjobb a HeLa emésztmény tisztítására. Mivel ez egy kétlépéses tisztítás, további vizsgálatokat végeztem annak kiderítésére, hogy **önmagában csak az első lépés, a C₁₈ tisztítás elvégzésével milyen eredmény érhető el a C₁₈+TopTip módszerhez képest**, és mekkora hatékonyságnövekedés tapasztalható a második lépéssel, azaz az áteső és mosási frakció további TopTip-es tisztításával. Ezért készítettem újabb 3-3 párhuzamos mintát, melyeknél 1-1 µg HeLa emésztményt C₁₈+TopTip, illetve C₁₈ módszerrel tisztítottam és 3 referenciamintát a korábban leírt eljárásnak megfelelően.

A Byonic-kal történő adatbáziskeresés során megbízhatóan azonosított fehérjék és peptidek száma a 6. ábrán szerepel. Ebben az esetben a tisztított mintákból több fehérje volt azonosítható, mint a referenciában, az előző mérésorozatban viszont a referencia mintából sikerült a legtöbb fehérjét azonosítani. A két mérésorozat közötti eltérés azonban a mérési módszerek szórásán belül van.

A C₁₈ és C₁₈+TopTip módszereket összevetve megfigyelhetjük, hogy **átlagosan 30-cal több fehérje volt azonosítható az áteső és mosási frakció további tisztításával**. Ez a növekedés nem jelentős, így a gyakorlatban valószínűleg nem éri meg alkalmazni a kombinált SPE-t általános proteomikai mintákra.



6. ábra. HeLa-ból azonosított fehérjék és peptidek száma egylépéses C₁₈ tisztítás, C₁₈+TopTip grafit kombinált tisztítás és a referencia esetén.

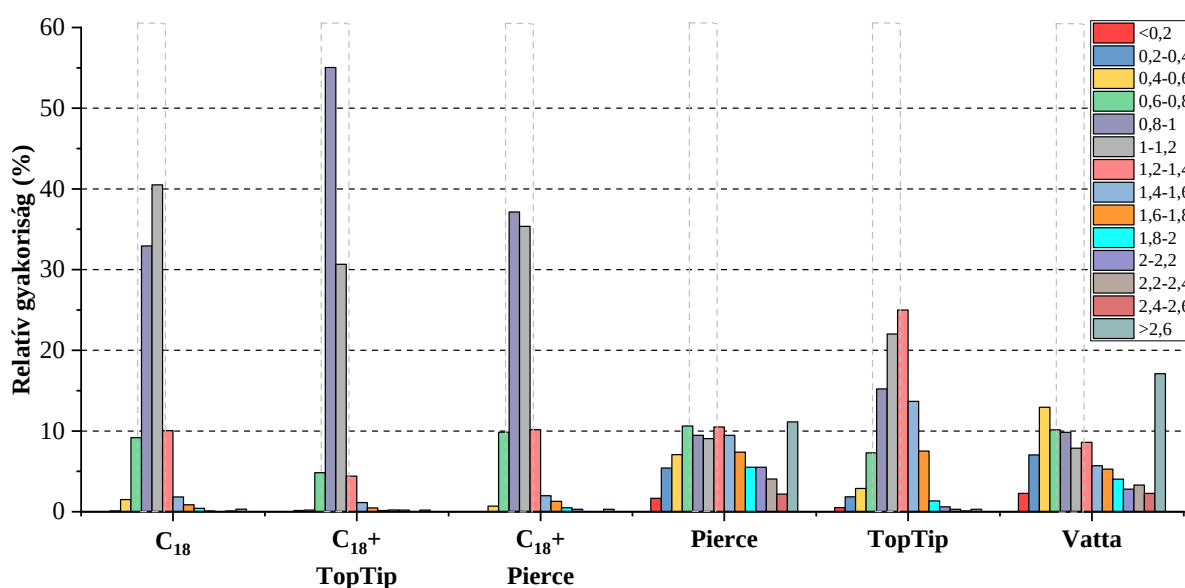
Következő lépésként megvizsgáltam, hogy peptidszinten megfigyelhetők-e jelentős eltérések a különböző tisztítási módszerek között. **Az azonosított peptideket a peptidhosszak, a GRAVY-indexek, valamint az izoelektromos pontok eloszlása alapján csoportosítottam.** A különböző SPE tisztítások után azonosított peptidek eloszlását peptidhossz, GRAVY-index és izoelektromos pont szerint rendre a *Függelék 2-4. ábráin* mutatom be.

Mindhárom tulajdonság alapján azt tapasztaltam, hogy **a módszerek jelentős részének alkalmazása nem, vagy csak minimálisan torzít a referenciamódszerhez képest.** A peptidhossz tekintetében a grafitos állófázisok (Pierce, TopTip) a rövidebb peptidekre, izoelektromos pont tekintetében a Pierce a bázikus peptidekre mutat szelektivitást. A vatta használata esetén a hidrofil peptidek nagymértékű feldúsulása tapasztalható. A részletes eredmények a *Függelék F1. Szelektivitás vizsgálata szokványos hidrofobicitás-eloszlású proteomikai minták tisztítása esetén* c. fejezetében találhatók.

4.1.1.1. SPE rendszerek összehasonlítása mennyiségi meghatározási szempontból

A kvalitatív információk mellett célom volt mennyiségi összehasonlítást is tenni a különböző fehérjékre vonatkozóan a MaxQuant program segítségével. A **mennyiségi meghatározást jelölésmentes módon végeztem** és megvizsgáltam, hogy hogyan alakult az adott fehérje LFQ intenzitása a referenciához képest. Az LFQ intenzitást a szoftver az MS/MS felvétel alapján azonosított prekursor peptid MS1 jelintenzitása alapján határozza meg. Az első mérősorozatban (ötféle SPE tisztítás és referencia) a MaxQuant összesen 1047 fehérjéről végzett mennyiségi meghatározást, a második mérősorozatban (kétféle SPE tisztítás és referencia) pedig 934 fehérjéről.

Egy-egy fehérje visszanyerését úgy számítottam ki, hogy az adott SPE tisztításhoz tartozó átlagos LFQ intenzitásértékét elosztottam a referenciamintákban az adott fehérjére kapott átlagos LFQ intenzitással. A fehérje visszanyerések eloszlása a 7. ábrán szerepel. Az eredményeket relatív skálán tüntettem fel, az összes mennyiségileg meghatározott fehérje számára normálva, azért, hogy a két mérősorozat összehasonlítható legyen.



7. ábra. HeLa fehérjék visszanyerésének eloszlása hat különböző SPE tisztítás esetén.

Megfigyelhetjük, hogy a visszanyerések eloszlása egészen eltérő mintázatot mutat a különböző SPE módszerek esetén. A C₁₈, és a C₁₈ alapú C₁₈⁺TopTip és C₁₈⁺Pierce technikák alkalmazása esetén az 1 körüli visszanyerések éles maximumot mutatnak. A TopTip esetén valamivel szélesebb az eloszlás, a Pierce és a vatta tisztítások használata pedig kifejezetten széles eloszlást eredményezett. Általánosan az SPE tisztítás során az a kedvező, ha nem torzít a módszer, hanem minél több fehérje visszanyerése 1 körüli, jelen esetben a 7. ábrán a 0,8 és 1,2 közé eső tartomány lenne ideális. Ezzel szemben ha a módszer egyes fehérjék peptidjeinek

mennyiségét jelentősen torzítja, és azok a tisztítás után kapott keverékben sokkal kisebb vagy nagyobb arányban lesznek jelen, mint a kiindulási mintában voltak, akkor könnyen téves következtetésre juthatunk a valós biológiai minták vizsgálata során. Emellett felmerülhet az a probléma is, hogy egyes peptidek csökkenő mennyisége más peptidek hatékonyabb ionizációját teszi lehetővé, ezzel torzítva az intenzitásokat és csökkentve az LFQ normalizáló algoritmus pontosságát. Ilyen szempontból a C_{18} alapú módszerek egyértelműen jobbnak bizonyultak a többinél.

A C_{18} alapú eljárásokat összehasonlítva elmondható, hogy a referenciában és az adott módszerben is azonosított fehérjék 75%-a esik az ideális, 0,8-1,2 közti tartományba a C_{18} és a C_{18} +Pierce esetén, míg a C_{18} +TopTip tisztításnál ez az arány 88%, tehát **a kvantitatív eredmények tekintetében is a C_{18} +TopTip bizonyult legjobbnak**. Érdekes különbség, hogy a C_{18} -nál több az 1-1,2 közti visszanyerés, míg a kombinált módszerek, különösen a C_{18} +TopTip alkalmazása esetén inkább a 0,8-1 közti tartományba esnek a visszanyerés-értékek. Ennek oka az lehet, hogy a kétlépéses módszernél kétszer pároltam be a minta nagy részét, mivel a C_{18} elúciós oldat bepárlása során visszamaradó szilárd anyagra pipettáztam rá az áteső frakció grafitos tisztítása során nyert elúciós oldatot és pároltam be újra. A kétszeres bepárlás során nagyobb mintaveszteségek léphetnek fel, mint az egylépéses eljárásoknál.

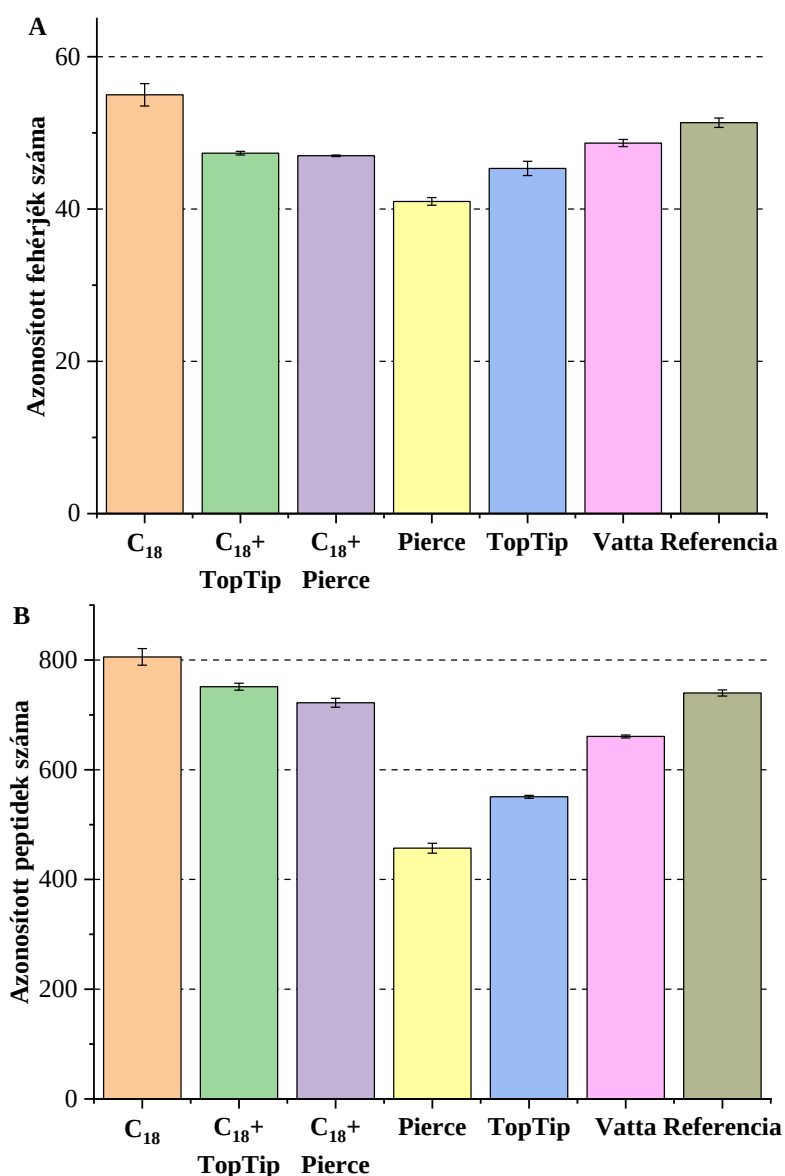
Az egyes elemzési szempontok eredményeit összevetve, **a vizsgált módszerek közül a C_{18} +TopTip eljárás az optimális a HeLa emésztményre és más, szokványos hidrofobicitás-eloszlású proteomikai mintákra**. A nyereség azonban az egylépéses C_{18} módszerhez képest nem túl nagy, jelen esetben átlagosan kb. 30 fehérje volt, valamint a C_{18} tisztítás csak igen kismértékű torzítást mutat a referenciához és a C_{18} +TopTip alkalmazásához képest, viszont az áteső frakció bepárlása és további tisztítása duplájára növeli a mintaelőkészítési folyamat hosszát. **A csekély nyereséget, valamint a nagy plusz időigényt és anyagi ráfordítást figyelembe véve a gyakorlatban a legtöbb esetben nem éri meg a kombinált módszert alkalmazni, hanem megelégedhetünk a C_{18} tisztítással.**

4.1.2. SPE módszerek összehasonlítása hidrofил minták tisztítása esetén

Miután elvégeztem a vizsgálatokat a HeLa mintára, célom volt tanulmányozni, hogy egy jóval polárisabb, erősen glikozilált minta tisztítása során milyen eredmények érhetők el a különböző SPE eljárásokkal, és a módszerek teljesítőképessége mennyire tér el az általános és az alapvetően hidrofил jellegű minták esetén. Ehhez a kísérletsorozathoz **emberi vérplazma HPLC-vel frakcionált egyik frakcióját használtam**, amelyet a „*bottom-up*” proteomikában

általánosan alkalmazott gyakorlat szerint peptidekké emésztettem a 3.2.1. *Minták előkészítése* fejezetben bemutatott eljárás szerint. Mivel ez a minta a korábbival ellentétben tartalmazott szennyezőket és az emésztés során használt reagensek maradványait is, ezért nem lehetett tisztítás nélkül, közvetlenül a HPLC-MS-be injektálni; így nem volt lehetőségem olyan referenciát készíteni, mint amit a HeLa-nál használtam. Ennek kiküszöbölésére egy gyártói ajánlás alapján készített, nem optimált C₁₈ módszert tekintettem referenciának. Az alkalmazott tisztítási módszerek a következők voltak: C₁₈, C₁₈+TopTip, C₁₈+Pierce, TopTip, Pierce, vatta, gyártói C₁₈ (a továbbiakban: referencia). (ld. 2. táblázat)

Mind a hét SPE tisztítást 3-3 párhuzamos mintán végeztem el, melyek 1-1 µg vérplazma frakciót tartalmaztak. A megbízhatóan azonosított fehérjék és peptidek számának alakulása a 8. ábrán látható.



8. ábra. Vérplazma frakcióból azonosított fehérjék és peptidek száma hét különböző SPE tisztítás esetén.

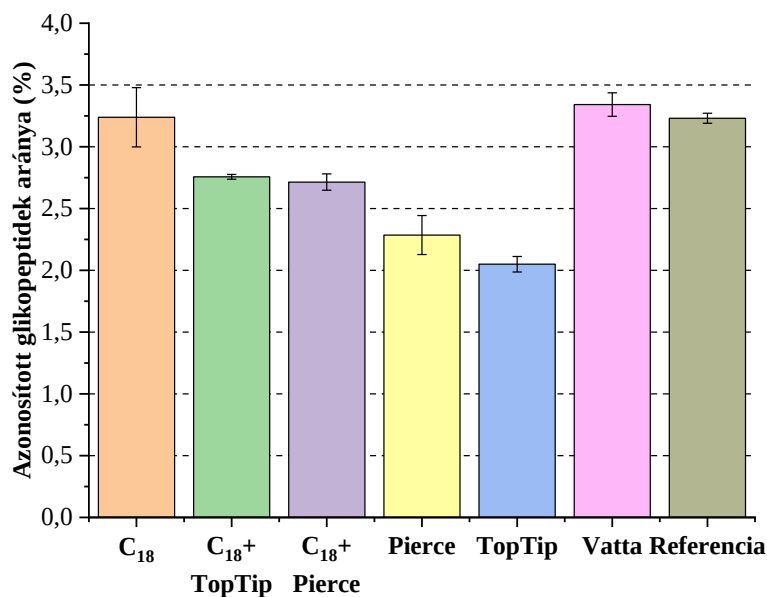
Az azonosított peptidek és fehérjék számát tekintve a legtöbb azonosítás a C₁₈ módszer esetén történt, a kombinált C₁₈+TopTip és C₁₈+Pierce eljárások alkalmazása rosszabb eredményhez vezetett. Ennek az elsőre meglepőnek tűnő jelenségnek a hátterében az állhat, hogy a minta nagy része a kombinált technikák esetén kétszer kerül bepárlásra, így a bepárlás során fellépő veszteségek is kétszer jelentkeznek. Amennyiben a második bepárlás során jelentkező veszteség nagyobb, mint a nyereség a kombinált módszer második lépésében, akkor összességében kedvezőtlenebbnek fog bizonyulni a kombinált módszer, mint az egy lépéses tisztítás. Mind peptid-, mind fehérjeszinten azt tapasztaltuk, hogy az egy lépéses C₁₈ tisztítás előnyösebb, mint a kombinált módszerek, ugyanakkor az is látható volt, hogy az általános proteomikai mintához hasonlóan a vérplazma frakció esetén is a kétféle kétlépéses tisztítás közül a C₁₈+TopTip módszer alkalmazása tette lehetővé több peptid és fehérje azonosítását.

Az egy lépéses eljárások közül a C₁₈ után második legjobbnak a referenciamódszer (gyártói C₁₈ módszer) bizonyult, és a vatta alkalmazásával is jó eredmény volt elérhető. A TopTip és a Pierce tisztítások használata azonban a többinél jóval gyengébb teljesítményt eredményezett.

A peptidek és fehérjék azonosítását követően **megvizsgáltam, hogy az egyes eljárások mutatnak-e szelektivitást peptidszinten, peptidhossz, hidrofobicitás (GRAVY-index) vagy izoelektromos pont tekintetében.** A kapott eredményeket a *Függelék 5-7. ábráin* mutatom be.

A peptidhossz eloszlásokat megvizsgálva hasonló eredményt kaptam, mint a HeLa esetén: a grafitos (Pierce, TopTip) állófázisok alkalmazása nagyobb, a vatta alkalmazása kisebb mértékben a rövidebb peptidek feldúsulását eredményezte. **A GRAVY-index és az izoelektromos pont tekintetében egyik módszer használata esetén sem tapasztaltam jelentős szelektivitást.** Az eredményeket a *Függelék F2. Szelektivitás vizsgálata hidrofíl minták tisztítása esetén c. fejezetében* részletesen is tárgyalom.

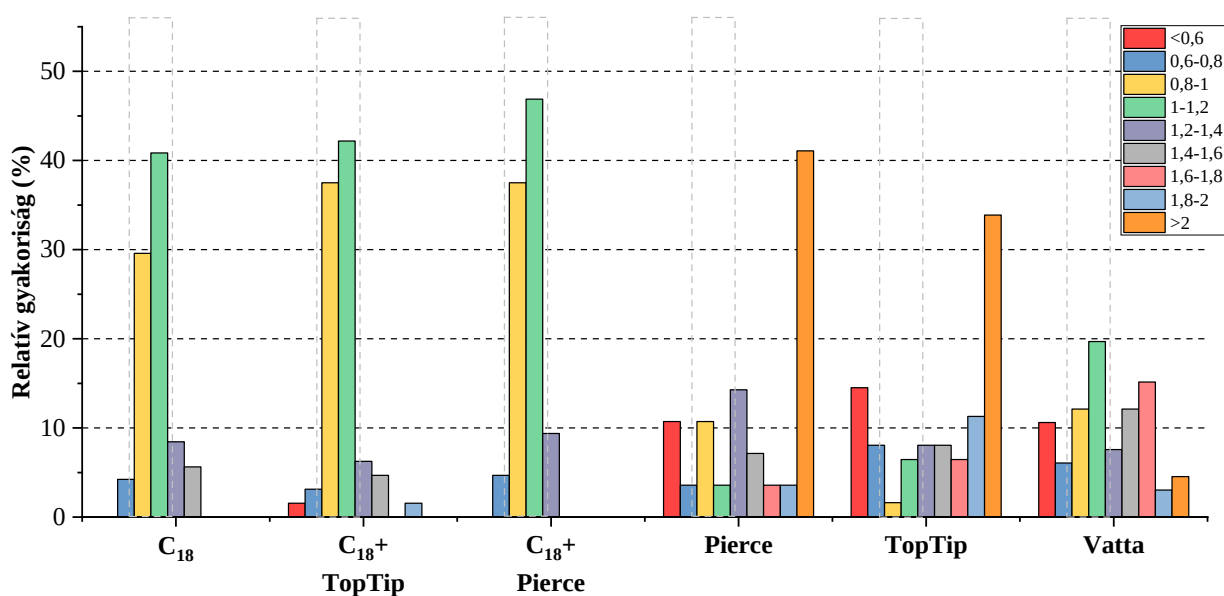
Következő lépésként megvizsgáltam, hogy tapasztalható-e eltérés a különböző tisztítások esetén **azoknak a peptideknek a számában, amik az N-glikopeptidekre jellemző konszenzus szekvenciát tartalmazzák.** Az ezen szekvenciát tartalmazó peptidek számának arányát az összes azonosított peptid számához viszonyítva a *9. ábrán* mutatom be. Ez azért érdekes információ, mert a vatta állófázist alkalmazó SPE módszert kifejezetten N-glikopeptidek tisztítására és dúsítására fejlesztették ki. Mivel itt a legnagyobb a konszenzus szekvenciát tartalmazó peptidek aránya a tisztítás után kapott mintában, a **glikopeptidek vizsgálatára valóban a vatta lehet a legalkalmasabb a vizsgált tisztítások közül,** azonban a C₁₈ módszerek alkalmazásával is közel azonos eredmények érhetők el.



9. ábra. Vérplazma frakcióból azonosított, N-glikopeptidekre jellemző konszenzus szekvenciát tartalmazó peptid aránya hét különböző SPE tisztítás esetén.

4.1.2.1. SPE rendszerek összehasonlítása mennyiségi meghatározási szempontból

A kvalitatív azonosítást követően a 4.1.1.1. SPE rendszerek összehasonlítása mennyiségi meghatározási szempontból fejezettel megegyezően mennyiségi jellemzést is végeztem a MaxQuant programmal, annak meghatározása céljából, hogy melyik esetben milyen eloszlást mutatnak a visszanyerések a referenciához képest. Ennek eredményét a 10. ábrán tüntettem fel.



10. ábra. Vérplazma frakcióból származó fehérjék visszanyerésének eloszlása hat különböző SPE tisztítás esetén.

A HeLa-nál tapasztaltakhoz hasonlóan a vérplazma esetén is **a C₁₈ és a C₁₈ alapú kombinált módszereknél a legtöbb fehérje visszanyerése 0,8-1,2 közti, míg a grafitos (Pierce, TopTip) és vatta tisztítások széles eloszlást mutatnak**, azaz sok fehérjét jelentősen eltérő mennyiségben tartalmaznak, mint a referencia (gyártói C₁₈ eljárás). A C₁₈ esetén az optimális tartományba a referenciában és a mintában is azonosított fehérjék 79%-a, C₁₈+TopTip esetén a 82%-a, C₁₈+Pierce esetén a 86%-a esett, tehát a kvantitatív eredmények tekintetében a C₁₈+Pierce módszer az optimális. A 10. ábrán látható, hogy a HeLa-nál tapasztalt jelenség, miszerint a kombinált eljárások esetén relatíve több az 1-nél kisebb visszanyerést mutató fehérje, mint az egylépéses C₁₈ esetén, kismértékben itt is megfigyelhető volt.

Az összes eredményt összevetve megállapítható, hogy a vérplazma frakció tisztításánál nem volt egyetlen módszer, ami minden szempontból a legjobban teljesített volna. Azonban **a C₁₈, aminek az alkalmazása a legtöbb peptid és fehérje azonosítását tette lehetővé, egy megfelelő kompromisszum**, mivel nem mutat jelentős torzítást sem minőségi, sem mennyiségi szempontból.

4.1.3. SPE eredmények általános összevetése

A HeLa és a vérplazma frakció vizsgálata során kapott eredményeket összehasonlítva elmondható, hogy **a tisztítási módszerek teljesítőképessége hasonló trendeket mutatott a szokványos hidrofobicitás-eloszlású proteomikai minta és a hidrofil minta esetén**. Kivételt képez a vatta-alapú SPE rendszer, amelynek alkalmazása a hidrofil vérplazma mintára jobb teljesítményjellemzőket eredményezett. Ez azt bizonyítja, hogy a HILIC állófázisként alkalmazott vatta elsősorban a hidrofil anyagok tisztítására és/vagy dúsítására alkalmas. A másik fontos különbség, hogy a HeLa esetén a kombinált C₁₈+TopTip tisztítás alkalmazása több peptid és fehérje azonosítását tette lehetővé, mint az egylépéses C₁₈, a hidrofil vérplazmafrakció esetén viszont ez a sorrend felcserélődött.

Peptidszinten az egyes eljárások hasonló irányba torzítottak a peptidhossz tekintetében a szokványos hidrofobicitás-eloszlású és a hidrofil minta esetén, viszont a GRAVY-index és az izoelektromos pont szerinti szelektivitás főleg csak a szokványos peptideloszlású HeLa minta esetén volt tapasztalható, a hidrofil minta esetén nem, vagy csak kisebb mértékben voltak megfigyelhetők ezek a hatások.

Végül, de nem utolsósorban a mennyiségi jellemzés alapján megfigyelhetjük, hogy **a peptidek visszanyerései egy referencia módszerhez képest széles eloszlásokat eredményeztek**. Ennek oka az lehet, hogy az egyes módszerek kis szelektivitáskülönbségei is jelentős különbségeket okozhatnak a minták HPLC-MS/MS mérése során fellépő koelúcióban

és elválasztásban, így befolyásolva a pontos mennyiségi meghatározás lehetőségeit. Az általános és a hidrofil minta esetén is **a C₁₈ és a C₁₈ alapú kombinált módszerek alkalmazásával érhető el szűk eloszlású, 100% körüli várható értékű visszanyerés**, míg a vatta, a Pierce és a TopTip jelentősen torzították a mért összetételt a referenciához képest.

A szilárdfázisú extrakciós módszerek összehasonlítása során nyert eredményeim hasznosak lehetnek bármilyen proteomikai vizsgálat során a megfelelő tisztítási módszer kiválasztásához. Általánosan, **ha a célunk a lehető legtöbb peptid és fehérje azonosítása jelentős minőségi és mennyiségi torzítás nélkül, minél rövidebb idő alatt, akkor a minta hidrofil/hidrofób jellegétől függetlenül a C₁₈ eljárás a legjobb választás**. Dolgozatom további részében az általánosan legjobbnak bizonyult, optimált C₁₈ módszert alkalmaztam a minták tisztítására.

4.2. ALK génátrendeződést mutató tüdőmetszetek proteomikai vizsgálata

Munkám során 7 ALK-pozitív páciens tüdőtumoros szövetmetszeteivel dolgoztam, melyekről összesen 23 régióban végeztem **szövetfelületi emésztést**. A metszetek H&E festett képe a *Függelék 1. ábráján*, a minták patológia, mucintartalom és stromatartalom szerinti jellemzése a *Függelék 1. táblázatában* látható.

A 22 egyedileg vizsgált terület csoportosítása több szempontból is lehetséges. Az egyik lehetőség a szöveti régiók osztályozása **patológiai besorolás** szerint (környező normál, tubuláris tumor, papilláris tumor, szolid tumor). Egy másik csoportosítási szempont a **mucintartalom** szempontjából különböző (környező normál, mucinózus tumoros és szolid tumoros) mintacsoportok. Eszerint a két csoportosítás szerint mind minőségi, mind mennyiségi elemzést is végeztem, továbbá kvantitatív szempontból vizsgáltam a mucint és stromát eltérő mennyiségben tartalmazó szövetek közti különbségeket. A csoportosítási szempontokat és az egyes mintacsoportokba tartozó minták számát a 4. táblázatban foglaltam össze.

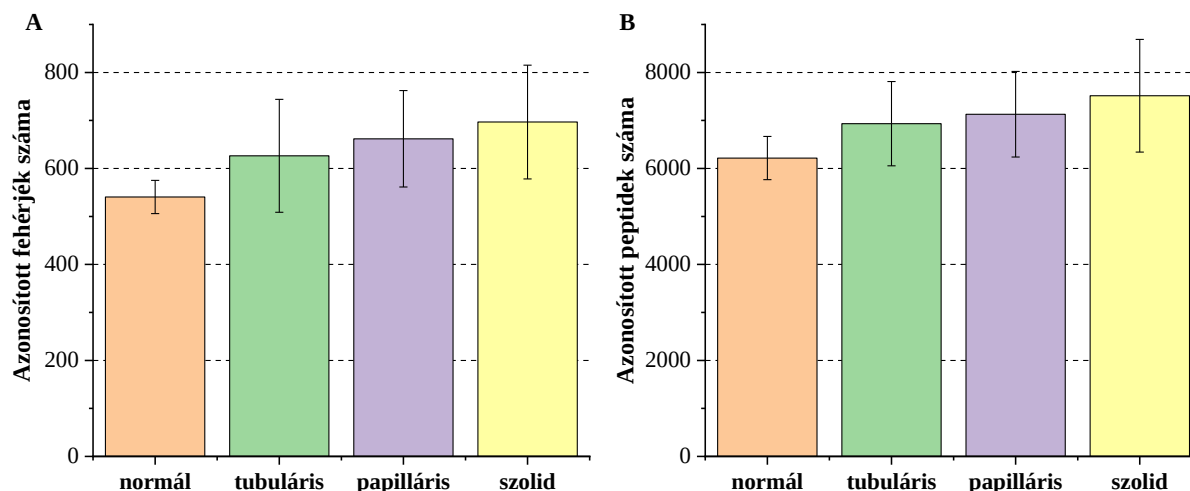
4. táblázat. A minták csoportosítási szempontjai és az egyes mintacsoportokba tartozó minták száma. A mucin és stroma mennyiségénél szereplő számozás jelentése: 1 – enyhe, 2 – közepes, 3 – erős.

Patológiai besorolás		Mucintartalom	
Csoport	minták száma	csoport	minták száma
normál	4	normál	4
tubuláris	3	mucinózus	5
papilláris	5	szolid	10
szolid	10		
		Stroma mennyisége	
Mucin mennyisége		csoport	minták száma
Csoport	minták száma	S1	5
M2	4	S2	5
M3	5	S3	7

4.2.1. Eltérő patológiai besorolású szöveti régiók fehérjéinek minőségi összehasonlítása

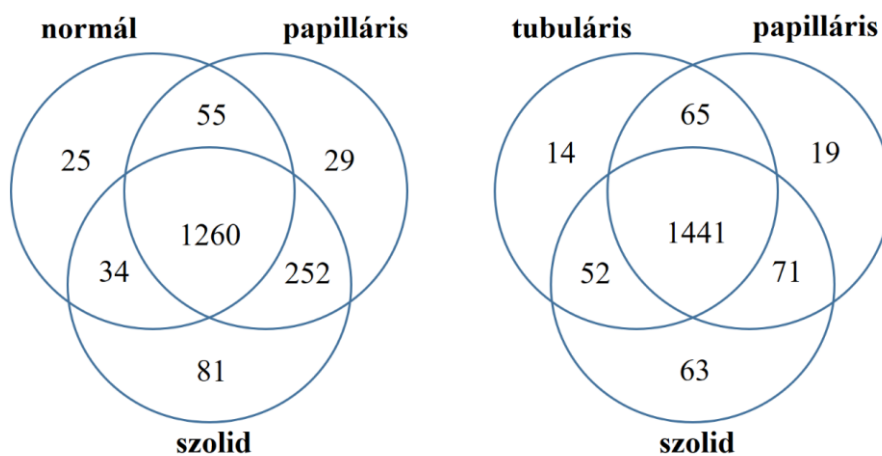
A vizsgálati területek egy része a tumoros régió melletti **normál** (nem tumoros) szövethez tartozott (4 db minta), valamint háromféle tumoros régió volt megkülönböztethető: **tubuláris** (3 db), **papilláris** (5 db) és **szolid tumor** (10 db). A fehérjék kvalitatív meghatározásához a Byonic szoftvert alkalmaztam. A megbízhatóan azonosított peptidek és fehérjék számának alakulását a 11. ábrán mutatom be eszerint a csoportosítás szerint. Az ábrán megfigyelhető, hogy **a tumoros szövetekben többféle fehérje expresszálódik, mint az egészséges szövetekben**. Számszerűleg a környező normál mintákból átlagosan 540,

a tubuláris tumorból 626, a papilláris tumorból 662, a szolid tumorból 697 fehérje volt azonosítható.



11. ábra. Patológiai szempontból eltérő csoportokban (környező normál; tubuláris, papilláris és szolid tumor) azonosított fehérjék és peptidok száma.

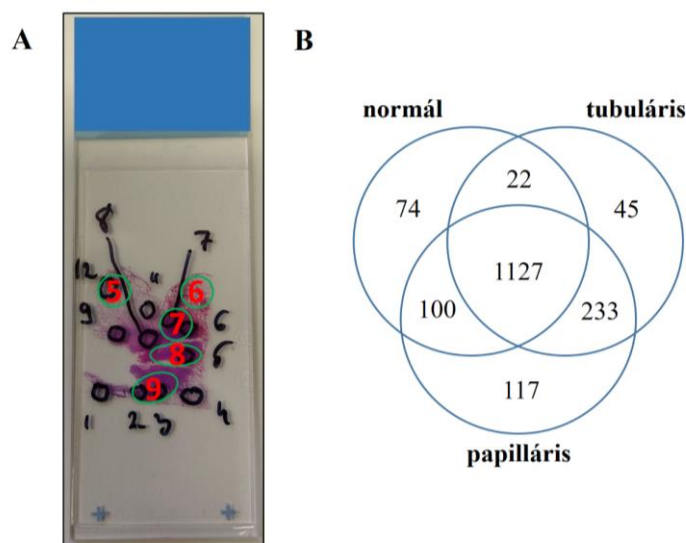
A négy csoport közti találatokat a Scaffold programmal hasonlítottam össze. A pontos összehasonlítás érdekében minden csoporthoz kiválasztottam azt a 3 mintát, melyekből a Byonic keresés során a legtöbb fehérje volt azonosítható. Az egyedileg azonosított fehérjék száma alacsony volt a környező normál, a tubuláris, a papilláris és a szolid tumoros mintacsoportokban is, de **a csak tumoros mintákban azonosított fehérjék száma jelentősen nagyobb volt**, százas nagyságrendbe esett (12. ábra). Például a környező normál mintacsoportban egyedileg azonosított fehérjék száma mindössze 25 volt, míg a szolid és papilláris tumorban azonosított, de a környező normál szövetben nem azonosított fehérjék száma 252.



12. ábra. Patológiai szempontból eltérő csoportokban (környező normál; tubuláris, papilláris és szolid tumor) azonosított fehérjék összehasonlítása. Minden csoport 3-3 mintát tartalmazott.

Az egyedileg azonosított fehérjék között nem fedeztem fel egyértelműen kimutatható funkcionális kapcsolatokat, így nem találtam olyan biológiai folyamatot szabályzó mechanizmust, amelynek teljes be- vagy kikapcsolódása kimutatható lett volna a különböző patológiájú tumorok között.

Következő lépésben megvizsgáltam, hogy **egy adott beteg metszetén belül** elhelyezkedő három különböző patológiai besorolású régió milyen mértékben tér el egymástól kvalitatív azonosítás szempontjából (13. ábra). A metszet 5 és 6 számú területei a környező normál, a 7 a tubuláris tumoros, a 8 és a 9 a papilláris tumoros régióba estek.

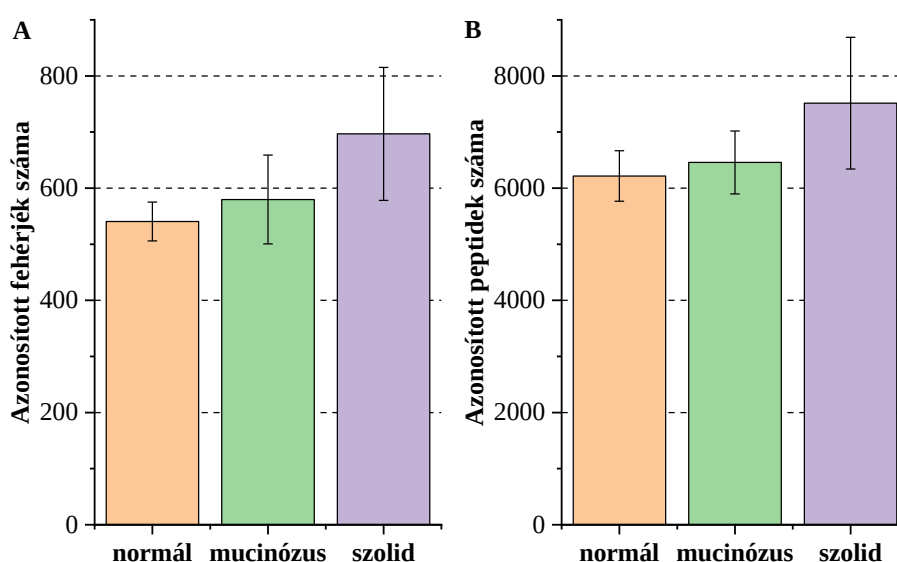


13. ábra. A vizsgálati metszet képe és a metszeten található különböző patológiájú (környező normál; tubuláris, papilláris tumor) minták fehérjéinek összehasonlítása. Az 5-ös és 6-os terület normál, a 7-es tubuláris, a 8-as és 9-es területek papilláris tumoros régiókat jelölnek.

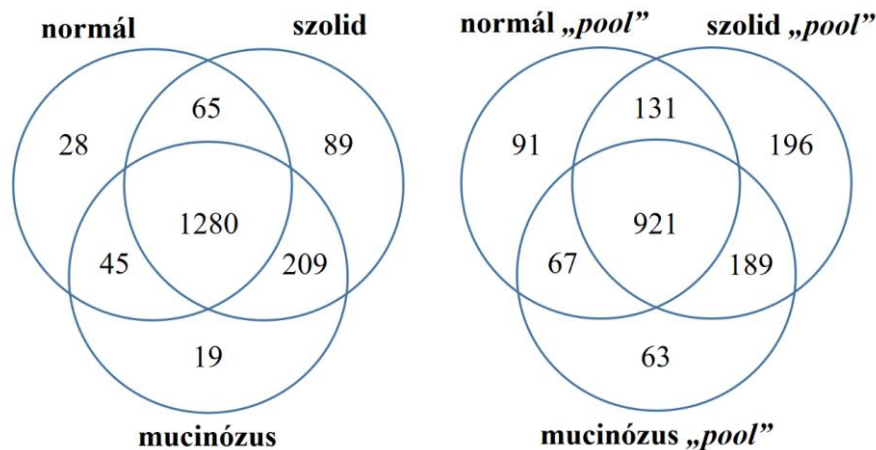
Megállapítható, hogy az egyedi metszeten belüli heterogenitás (13/B. ábra) hasonló, azonban nagyobb mértékű, mint amikor ezeket az eltéréseket különböző metszeken lévő azonos patológiájú régiók összehasonlításával vizsgáltuk (12. ábra). Ez annak tudható be, hogy több minta mérése során növekszik az azonosított fehérjék száma az adott csoportban (egyrészt az azonos csoportba tartozó régiók egymástól való eltérősége miatt, másrészt mérés technikai okokból), így növekszik annak a valószínűsége is, hogy bizonyos csoportok közötti azonosságokat és különbségeket fedezünk fel.

4.2.2. Eltérő mucintartalmú szöveti régiók fehérjéinek minőségi összehasonlítása

Egy másik hasonló, de némileg eltérő osztályzási lehetőség a minták csoportosítása a mucin fehérjék mennyisége szerint. A környező normál szövetek és a szolid tumor jellemzően nem tartalmaznak ilyen fehérjét, míg a tubuláris és papilláris tumorban több mucin található. A mucinban gazdag, ún. **mucinózus tumoros** mintákat (Függelék 1. táblázatban hármas pontszámmal jellemzett minták, 5 db) hasonlítottam össze a **környező normál** mintákkal (4 db) és a **szolid tumorral** (10 db). A normál és a mucinózus mintákból, valamint a szolid tumoros minták egy részéből az injektlás után visszamaradó folyadékokat összepipettáztam csoportok szerint egy-egy újabb „pool” mintává. Így nemcsak a 3 csoport tagjait, hanem a 3 „pool” mintát is össze tudtam hasonlítani. A 3 csoportban azonosított peptidek és fehérjék számát a 14. ábrán mutatom be, a 3 csoport elemeinek, illetve a 3 „pool” mintának a hasonlóságát pedig a 15. ábrán látható Venn-diagram szemlélteti. Minden csoporthoz azt a 4-4 mintát választottam ki, melyekből a Byonic keresés során a legtöbb fehérje volt azonosítható.



14. ábra. Környező normál; mucinózus és szolid tumorban azonosított fehérjék és peptidek száma.



15. ábra. Környező normál; mucinózus és szolid tumor csoportjában, illetve a csoportok „pool” mintáiban azonosított fehérjék összehasonlítása. Minden csoport 4-4 mintát tartalmazott, a „pool” minták pedig 5-5 normál és mucinózus, illetve 6 szolid tumoros mintából készültek.

A 15. ábrán látható eredmények azt mutatták, hogy a környező normál és a mucinózus tumoros csoportokban egyedileg azonosított fehérjék száma kevés volt, a csak szolid tumorban azonosított fehérjék száma viszont megközelítette a százat (89 az egyedi minták eredményeinek egyesítésével és 196 a „pool” minták vizsgálata során). Két-két csoport metszetét összehasonlítva a kétféle tumoros régió között nagyobb mértékű egyezés tapasztalható, mint bármelyik tumoros és a környező normál régió között. Ezzel szemben a „pool” minták esetén valamivel több volt az egyedileg azonosított fehérjék, illetve a csak 2 csoportban azonosított fehérjék száma, melynek oka az lehet, hogy itt csak egy-egy mérés tartozott a csoportokhoz.

A minőségi jellemzés során megállapítottam, hogy a tumoros szövetekben többféle fehérje expresszálódik, mint a környező normál szövetekben. Az egy-egy mintacsoportra jellemző, egyedileg azonosított fehérjék száma alacsony volt az összes mintacsoportban, viszont több száz olyan fehérjét találtam, melyek csak a tumoros mintákból voltak azonosíthatók.

4.2.3. Fehérjemennyiségi analízis eredményei

A kvantitatív értékeléshez a MaxQuant és a Perseus programokat használtam, a *Függelék 2-3. táblázatában* szereplő beállítások mellett. A mennyiségi vizsgálatokhoz használt csoportosítások a *4. táblázatban* találhatók.

4.2.3.1. Eltérő patológiai besorolású minták összehasonlítása

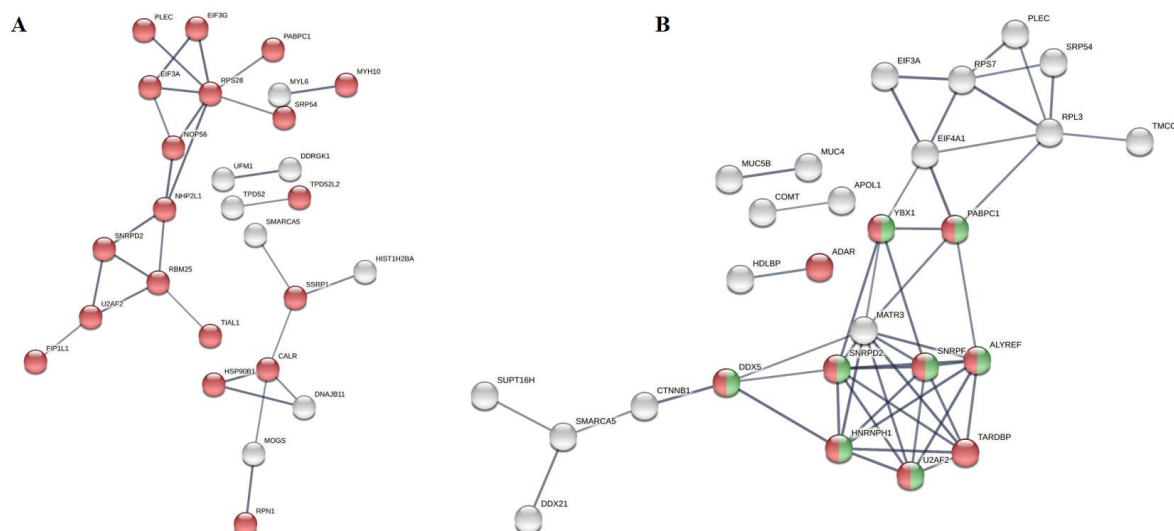
Az első összehasonlítás a patológiai besorolás szerint történt, amely négyféle csoport megkülönböztetését tette lehetővé: környező normál, tubuláris tumor, papilláris tumor és szolid tumor. A következőkben ezeket a csoportokat kezdőbetűikkel jelölöm. A négy csoport közötti szignifikáns változások azonosításához ANOVA-tesztet, majd post-hoc Tukey-tesztet végeztem. Az ANOVA alkalmazásával **összesen 317 fehérje mennyiségében mutattam ki szignifikáns változást**, melyek közül a 2-2 csoport közt szignifikánsan változó fehérjék számát az *5. táblázatban* foglaltam össze. Az eredményekből látható, hogy a környező normál és bármely tumoros csoport között legalább 131 fehérje mennyisége változott szignifikánsan, **de tetszőlegesen megválasztott két tumoros csoport között is tízes nagyságrendben találhatók szignifikánsan változó fehérjék**. A tubuláris és a papilláris tumoros régiók között változott a legkevesebb fehérje mennyisége szignifikánsan, tehát ezek a leghasonlóbb mintacsoportok.

5. táblázat. Patológiai szempontból eltérő csoportok között szignifikánsan változó fehérjék száma.

Összehasonlított csoportok	N – T	N – P	N – S	T – P	T – S	P – S
Szignifikánsan változó fehérjék száma	131	181	282	16	50	63

A csoportpárok között szignifikánsan változó fehérjékre hálózatelemzést végeztem a STRING GO webszerver segítségével. A hálózatelemzés során információt kaphatunk arról, hogy a vizsgált fehérjék, melyeket a kapott ábrán egy-egy színes csomópont jelöl, milyen viszonyban állnak egymással. A fehérjék közti kapcsolatokat egy-egy él (összekötő vonal) jelöli. Amennyiben egy funkciós vagy lokalizációs klasztert találunk, azaz számos, egy adott folyamatban szerepet játszó vagy egy adott sejttérben jelenlévő fehérje jelenik meg, tűnik el, vagy változik meg a mennyisége, az a biológiai folyamat értelmezését segíti.

A tubuláris és papilláris mintacsoportok közt szignifikánsan változó fehérjék közt nem voltak interakciók megfigyelhetők. A másik két eltérő tumoros csoportpárra kapott eredményeket a *16. ábrán* mutatom be.

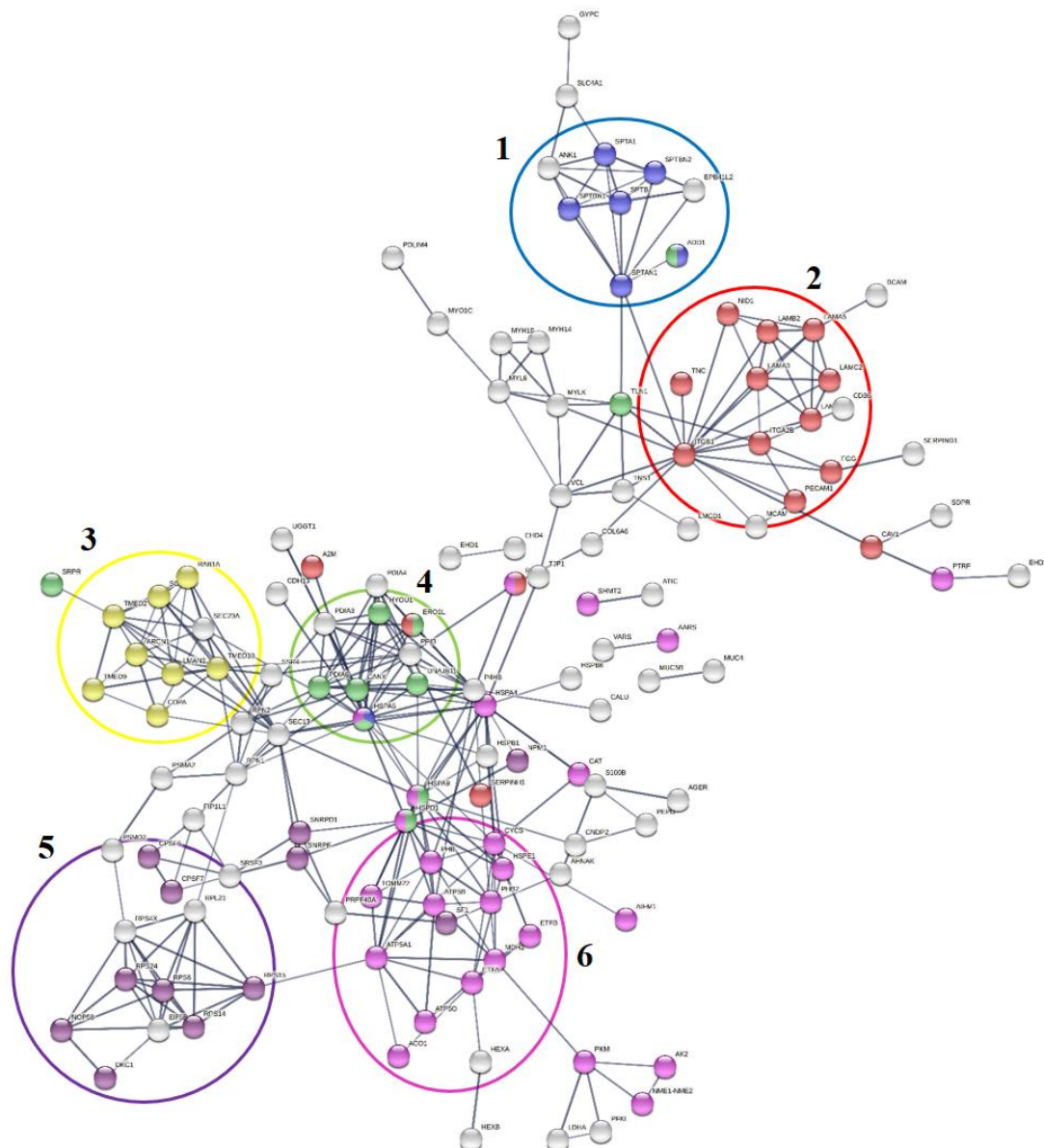


16. ábra. *A: a tubuláris és a szolid tumor, B: a papilláris és a szolid tumor között szignifikánsan változó fehérjékre épített fehérje interakciós hálózatok.*

Jelmagyarázat: A: piros: RNS kötő fehérje, B: piros: mRNS érésben szerepet játszó fehérje, zöld: mRNS „splicing”-ban szerepet játszó fehérje.

A 16. ábra azt mutatja, hogy a különböző tumortípusok között szignifikánsan változó fehérjék jelentős része a fehérjeszintézisben játszik szerepet. Ilyenek például az S28 riboszómális fehérje és a kis nukleáris ribonukleoprotein F. Az RNS kötő fehérjék az RNS-hez kötődnek és együtt ribonukleoprotein komplexet alakítanak ki, melynek kulcsszerepe van a transzkripcióban és a transzlációban, valamint a génexpresszió és az RNS metabolizmus szabályozásában⁷⁷. Az mRNS érési folyamatot is számos fehérje segíti, melyek közül több mennyisége jelentős változást mutat. Például a TAR DNS-kötő fehérje mennyisége szignifikánsan eltér a papilláris és szolid tumor között. Az érés során az információt nem kódoló intronok kivágódnak (ún. „splicing”) és további poszt-transzkripciós módosítások történnek meg, így alakul ki az érett mRNS, amiről a transzláció megtörténhet⁷⁷. **Mind az RNS kötő fehérjék, mind az mRNS érésben szerepet játszó fehérjék jellemzően alul-expresszálódnak a tubuláris és a papilláris tumorban egyaránt a szolid tumorhoz képest.** Az ún. „fold change” (az adott fehérjék két csoportban mért átlagos mennyiségének aránya) rendre 0,63, illetve 0,61 volt. A 16. ábrán látható eredmények arra utalnak, hogy a különböző típusú daganatok között igen eltérő a fehérjeszintézis szabályozása, ami további erre irányuló célzott vizsgálatoknak szolgáltat alapot.

A környező normál és az egyes tumoros mintacsoportok között szignifikánsan változó fehérjékre is STRING hálózatelemzést végeztem. Ezek közül a normál és papilláris minták között szignifikánsan változó fehérjékre kapott eredményt a 17. ábrán mutatom be, a további eredmények pedig a Függelék 8-9. ábráin találhatók.



17. ábra. A környező normál és a papilláris tumor között szignifikánsan változó fehérjékre épített fehérje interakciós hálózat.

Jelmagyarázat: **kék:** fehérje tartalmú komplexek képződésének negatív szabályozásában, **piros:** extracelluláris mátrix szerveződésében, **sárga:** Golgi → endoplazmatikus retikulum transzportban, **zöld:** nem megfelelően feltekeredett („unfolded”) fehérjére adott sejtválasz kialakításában, **sötétlila:** ribonukleoprotein komplex előállításában szerepet játszó fehérje, **rózsaszín:** mitokondriumban található fehérje.

A 17. ábrán látható, hogy a tapasztalt nagyszámú fehérje mennyiségi változás számos, változatos funkcióval, illetve lokalizációval hozható kapcsolatba.

Az 1-es és az 5-ös számú klaszter azt jelzi, hogy a fehérjetartalmú komplexek, beleértve az RNS-fehérje ribonukleoprotein komplexeket is, eltérő mennyiségben lehetnek jelen az egészséges és a tumoros sejtekben. Az 1-es klaszter tagjai alul-expresszálódtak („fold change”: 0,36), az 5-ös klaszter tagjai felül-expresszálódtak („fold change”: 2,04)

a tumorban a környező normál mintákhoz képest. Mivel a ribonukleoprotein komplexek előállításában szerepet játszó fehérjék mennyisége nő, a negatív szabályozás viszont visszaszorul, így a ribonukleoproteinek és egyéb komplexek nagyobb mennyiségben lehetnek jelen a tumoros mintákban, mint a környező normál szövetekben.

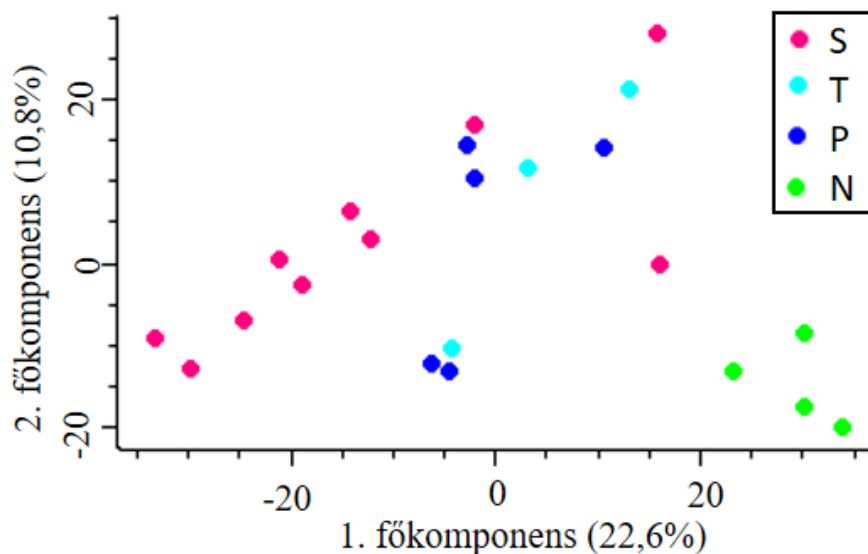
A 2-es klaszter tagjai az **extracelluláris mátrix szerveződésében** vesznek részt, melynek során az építőkövekből felépül, illetve szétesik alkotóira az extracelluláris mátrix. Ezek a fehérjék alul-expresszáldtak („*fold change*”: 0,29) a papilláris tumorban a környező normálhoz képest. Ez összhangban van azzal az irodalmi ismerettel, hogy a rákban az extracelluláris mátrix szintézise és kiválasztása közti egyensúly felborul⁷⁸, valamint jól mutatja, hogy a változások nemcsak sejtszinten következnek be.

A 3-as klaszterbe tartozó fehérjék olyan **transzportfolyamatokban** vesznek részt, mely során a Golgi-készülékből az endoplazmatikus retikulumba jutnak a Golgi-készülékben előállított, szerkezetileg módosított fehérjék. A transzport szabályozásában szerepet játszó fehérjéknek a felül-expressziója („*fold change*”: 2,07) felborítja a Golgi és az endoplazmatikus retikulum közti egyensúlyt⁷⁹.

A 4-es klaszterben található fehérjék az **„unfolded” fehérjékre adott sejtválasz kialakításában** játszanak szerepet és szintén felül-expresszáldtak („*fold change*”: 2,17) a tumorban a környező normál sejtekhez képest. Ennek hátterében az állhat, hogy a tumorban a nem vagy hibásan feltekeredett fehérjék száma megnő az egészséges sejtekhez képest⁸⁰, melynek megfelelő kezeléséhez a sejtválasz kialakításához szükséges fehérjék mennyiségének a növekedése is szükséges.

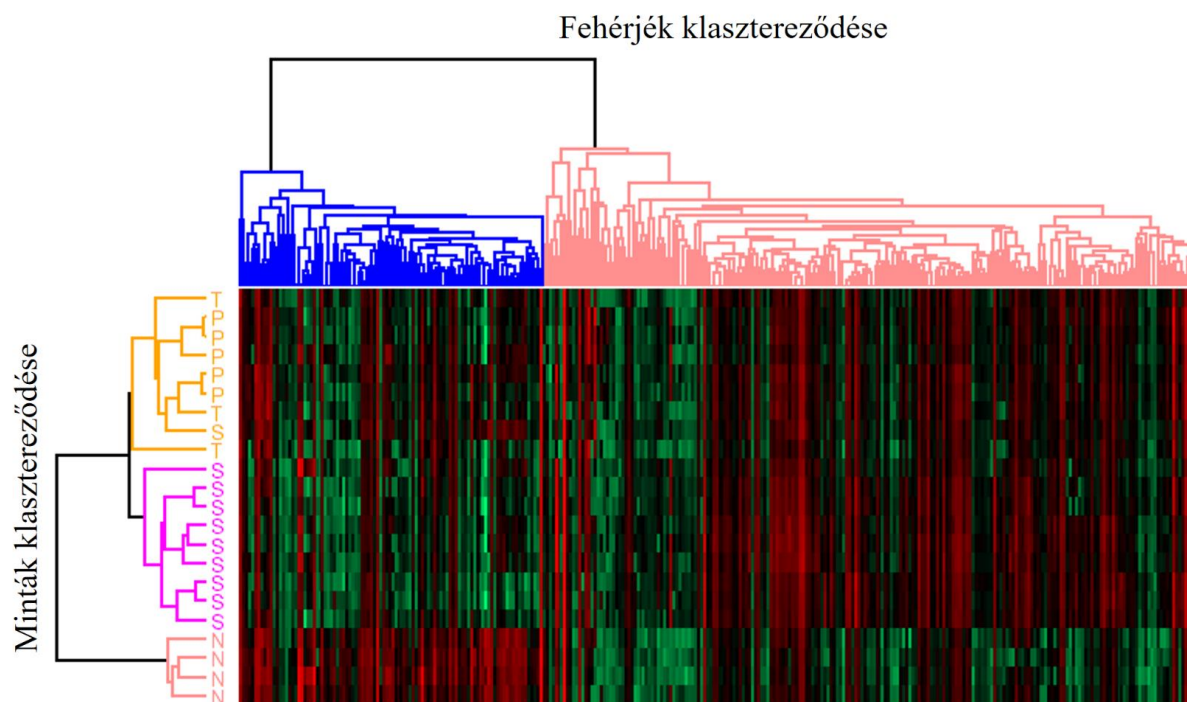
A 6-os klaszterbe tartozó fehérjék között lokalizációs kapcsolat áll fent: ezek a mitokondriumban találhatóak. Az eredmények azt mutatták, hogy ezek a fehérjék a tumorban felül-expresszáldtak a környező normál szöveti régiókhoz képest („*fold change*”: 1,74).

A következő lépésben **főkomponens-analízist végeztem**, melynek eredményét a 18. ábrán mutatom be. A főkomponens-analízis az összes fehérje mennyiségét tartalmazó sokdimenziós információt arra a két (lineáris kombinációval nyert) dimenzióra redukálja, melyek a minták közti különbségek (variancia) legnagyobb részét magyarázzák meg. A 18. ábrán látható, hogy **a környező normál minták élesen elkülönültek minden tumoros mintacsoporttól**. A szolid tumoros minták pontjai tízből hét esetben megbízhatóan egy tartományba estek, de a további szolid tumoros minták, valamint a papilláris és tubuláris minták nem váltak el egymástól a főkomponens-analízis során.



18. ábra. Főkomponens-analízis a patológiai szempontból eltérő csoportokra (környező normál; tubuláris, papilláris és szolid tumor). Az 1. főkomponens az adatok varianciájának 22,6%-át, míg a 2. főkomponens a 10,8%-át írja le.

A szignifikánsan változó fehérjékből klaszterezést követően hő térképet készítettem. A klaszterezés során sokdimenziós térben a pontokat az egymástól való távolságuk alapján csoportosítjuk. A hő térkép megmutatja, hogy az egyes fehérjeklaszterek tagjainak mennyisége hogyan változott a különböző mintaklaszterek között. A 19. ábrán látható hő térkép azt mutatja, hogy a környező normál minták együtt klasztereződnek és ezek térnek el a legjobban az összes többi mintától. A tumoros régiók közül a 10 szolid tumoros mintából 9 szintén együtt klasztereződik és csak egy szolid tumoros pont esik a papilláris és tubuláris minták közé. A papilláris tumoros pontok is egymáshoz viszonylag hasonlóak a klaszterszerkezet alapján, a tubuláris minták viszont egymástól nagymértékben különböznek és nem együtt klasztereződnek. A két fő fehérjeklaszter közül az egyik tagjai jellemzően alul-expresszálódnak (kék), a másik tagjai felül-expresszálódnak (rózsaszín) a tumorban a környező normál, nem tumoros szövetekhez képest.

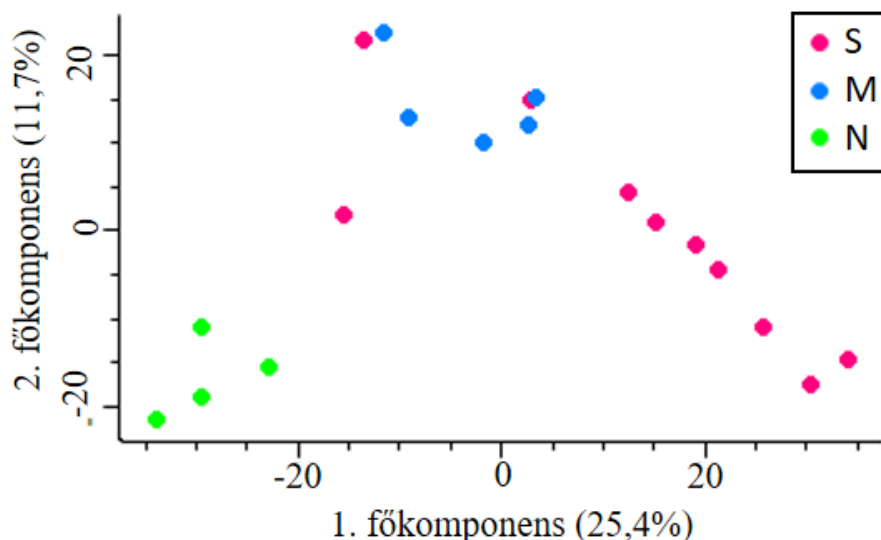


19. ábra. Hierarchikus klaszterezéssel készített hő térkép a különböző patológiai besorolású minták esetén.

4.2.3.2. *Eltérő mucintartalmú szövetek összehasonlítása*

Első lépésben a környező normál és a szolid tumoros mintákat összehasonlítottam a mucinózus tumoros régiókkal is mennyiségi szempontból. Az ANOVA és a Tukey-teszt szerint **összesen 455 fehérje mennyiségében volt megfigyelhető szignifikáns változás**, melyek közül 418 fehérje mennyisége a normál és a szolid tumor, 227 fehérje mennyisége a normál és a mucinózus tumor, 163 fehérje mennyisége pedig a kétféle tumoros mintacsoport között változott szignifikánsan.

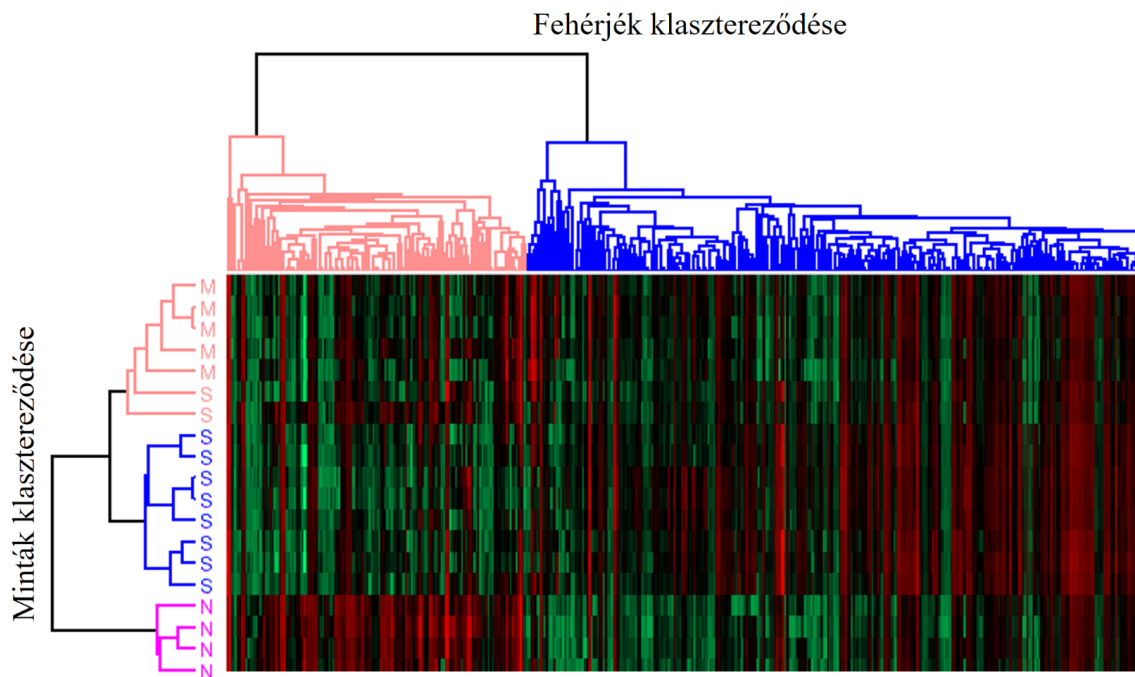
A háromféle csoportra főkomponens-analízist alkalmazva a 20. ábrát kaptam. Eszerint **a környező normál mintacsoport a tumoros pontoktól igen jól elkülönül, a tumoros mintacsoportok pontjai viszont részben együtt klasztereződnek**. A szolid tumoros minták közül ugyanaz a 3 mintaterület mutat eltérő tulajdonságokat a többitől, mint amik az előző csoportosításnál is kiugró pontok voltak.



20. ábra. Főkomponens-analízis a környező normál; mucinózus és szolid tumoros mintacsoportokra. Az 1. főkomponens az adatok variációjának 25,4%-át, míg a 2. főkomponens a 11,7%-át írja le.

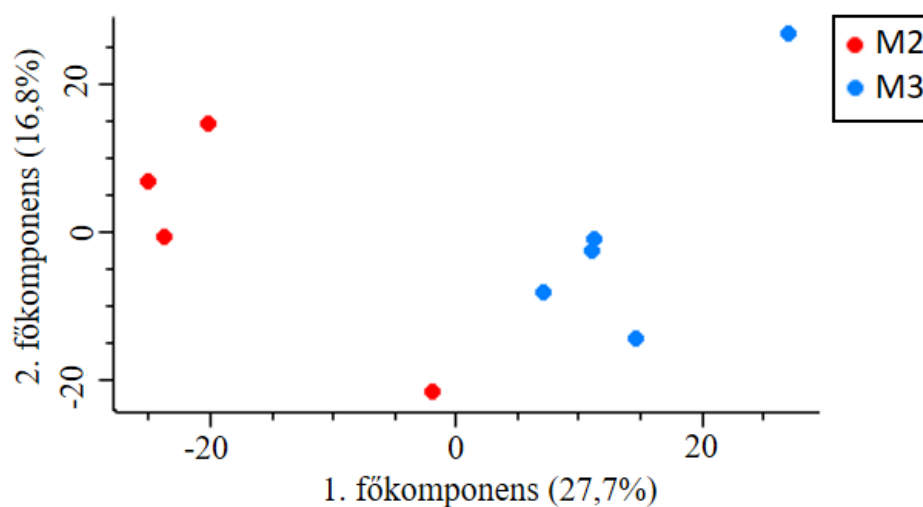
A három csoportra hierarchikus klaszterezést követően hőtérképet készítettem, melyet a 21. ábrán tüntettem fel. A klaszterszerkezet alapján a környező normál minták tértek el a legjobban az összes többitől, és a 10 szolid tumoros minta közül is 8 együtt klasztereződött. A maradék 2 szolid minta jobban hasonlított a mucinózus tumoros mintákra, mint a többi szolid tumorosra, viszont kevésbé hasonlítottak rájuk, mint a mucinózus tumoros minták egymásra.

A két legnagyobb fehérjeklaszter közül az egyik tagjainak jelentős része alul-expresszáldott (rózsaszín), a másik tagjai közül a legtöbb felül-expresszáldott (kék) a tumoros mintákban a környező normálhoz képest.



21. ábra. Hierarchikus klaszterezéssel készített hő térkép a különböző mucintartalmú régiók esetén.

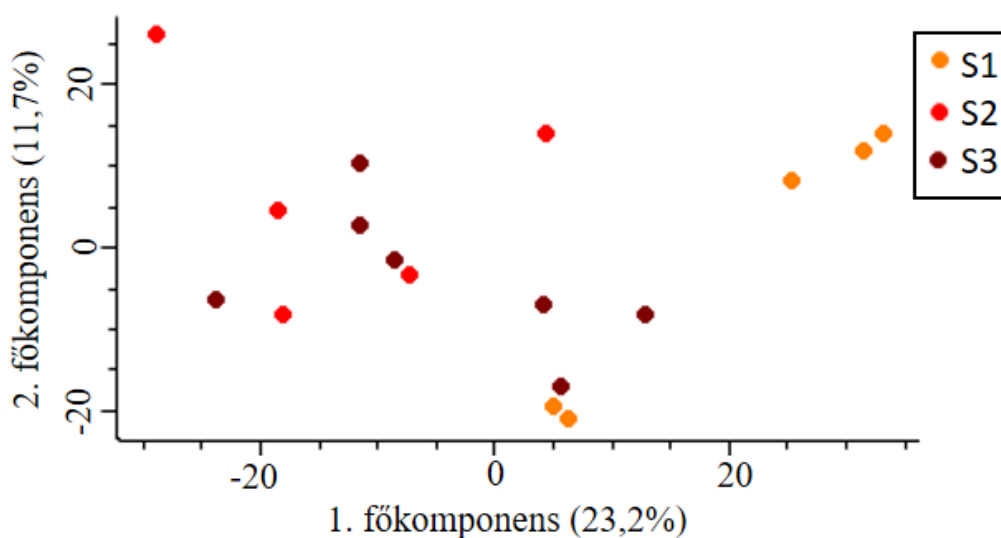
Második lépésben megvizsgáltam, hogy **a mucint közepes (M2) és nagy mennyiségben tartalmazó (M3) minták** között mennyire volt szignifikáns a különbség kvantitatív szempontból. A két csoportot Student-féle t-tesztel hasonlítottam össze, amely **6 fehérje mennyiségében mutatott szignifikáns eltérést a két csoport között.** A 6 fehérje a vezikán proteoglikán, a pulmonális felületaktív anyagokkal asszociált D fehérje, a mielin expressziós faktor 2 és háromféle immunoglobulin fehérje volt. A két csoport a főkomponens-analízis során (ld. 22. ábra) jól elkülönül egymástól.



22. ábra. Főkomponens-analízis a mucint eltérő mennyiségben tartalmazó csoportokra. Az 1. főkomponens az adatok variációjának 27,7%-át, míg a 2. főkomponens a 16,8%-át írja le.

4.2.3.3. Eltérő stromatartalmú szövetek összehasonlítása

Hasonlóképpen megvizsgáltam, hogy a stromát kis (S1), közepes (S2) és nagy mennyiségben (S3) tartalmazó minták között vannak-e szignifikáns különbségek egyes fehérjék mennyiségében. Az ANOVA alkalmazásával **22 fehérje mennyiségében mutattam ki szignifikáns változást**, melyek közül 22 fehérje az S1 és S2, 18 fehérje az S1 és S3, 7 fehérje pedig az S2 és S3 állapotok közt változott meg szignifikánsan mennyiségi szempontból. Például az A-kináz horgonyfehérje 12 mennyisége bármely két csoport között szignifikánsan változott. A 23. ábra azt mutatja, **hogy a három csoport nem válik el jól a főkomponens-analízis során**. Megfigyelhető, hogy az S1 minták ugyan majdnem teljesen elkülönülnek a többitől, az S2 és az S3 viszont teljes mértékben együtt klasztereződik. Tehát kijelenthetjük, hogy az eltérő stromatartalmú tumorok között szignifikánsan változó fehérjék száma alacsony, és a proteomikai profil alig függ a tumor stromájától.



4.2.4. Eredmények értékelése, kitekintés

A tudőmetszetek vizsgálata során kvalitatív és kvantitatív szempontból hasonlítottam össze környező normál és különböző típusú tumoros mintákat. A kvalitatív elemzésnél azt tapasztaltam, hogy a különböző csoportokban egyedileg azonosított fehérjék száma igen alacsony, és sem az egyedileg azonosított, sem a csak tumoros szövetekben azonosított fehérjék között nem találtam funkcionális vagy lokalizációs klasztereket. Kvantitatív szempontból nagyszámú fehérje mennyiségében figyeltem meg szignifikáns változást mind az egészséges és tumoros, mind a különböző típusú tumoros mintacsoportok között. A különböző típusú tumoros mintacsoportok között szignifikánsan változó fehérjék jelentős része a fehérjeszintézisben vesz részt, a környező normál és a tumoros mintacsoportok között szignifikánsan változó fehérjék pedig a fehérjeszintézis mellett több fontos biológiai funkcióval is összefüggésbe hozhatók. Ezeknek a folyamatoknak a változásai a tumorképződés okai vagy következményei lehetnek.

A tudőmetszetek vizsgálata során nyert eredményeim több szempontból is fontosak lehetnek. A rák kialakulása és összetettsége nem magyarázható csupán genetikai és transzkripciós szinten. Az expresszált fehérjékről a mennyiségi információ⁸¹, a fehérjéken található PTM-ek minősége és mennyisége, a fehérjék hatása és dinamikája, a szubcelluláris lokalizáció, a fehérje felhalmozódását vagy lebomlását szabályozó mechanizmusok mind rejtve maradnak a genomikai vizsgálat során⁸². **Ezért a betegség alaposabb megértéséhez a fehérjék részletes vizsgálata is szükséges.** A daganatok patofiziológiájának minél jobb megértése elengedhetetlen az **új terápiás gyógyszer-célpontok azonosításához és diagnosztikus eljárások kifejlesztéséhez.**

Kutatásom további jelentősége, hogy számos olyan fehérjét azonosítottam, melyek a környező normál és ALK-pozitív tüdő tumoros mintákban jelentősen eltérő mennyiségben voltak jelen. Ezek olyan **fehérje biomarkerek lehetnek, melyek az adott ráktípus diagnosztizálására alkalmasak.** Például tetszőleges tumoros régiókban az **ankirin-1 fehérje** átlagos **mennyisége 6-10-szer kisebb** volt, mint a környező normál szöveti régiókban. Az ankirinek olyan fehérjék, melyek az integrált membránfehérjék kötődését segítik a membránhoz⁸³. Ezeknek a fehérjéknek mennyiségi megváltozását és prognosztikus markerként való alkalmazhatóságát korábban már egy másik ráktípusban, az androgén receptor-pozitív mellrákban is leírták⁸⁴. A **mitokondriális FAHD1 acilpiruváz** mennyisége ellentétes irányban változott: a tumoros régiókban **10-18-szor nagyobb mennyiségben** volt jelen, mint a környező normál szövetben. Ez az enzim a szénhidrátok lebomlása során keletkező fumaril- és acetilpiruvátok szervezetben lejátszódó hidrolíziséért felelős⁸⁵. Biomarkerként korábban még nem alkalmazták.

Több olyan fehérjét is azonosítottam (például a mucin-5B, a laktotranszferrin és az apolipoprotein L1), amelyek mennyisége a különböző tumoros állapotok között legalább kétszeresére változott, így ezek a tumor típusának meghatározására is alkalmasak lehetnek.

Rutin eljárásban való alkalmazáshoz azok a vegyületek lehetnek megfelelő biomarkerek, melyek nemcsak szövetből, hanem **vérből, vizeletből vagy nyálból is kimutathatók**⁸². Így nem szükséges biopsziát venni, hanem egyszerű vérvétellel is lehetséges eldönteni, hogy a páciens az adott betegségben szenved-e. Az irodalomban az ankirin-1 fehérje és több más, vizsgálataimban a mintacsoportok közt szignifikáns változást mutató fehérje vérből történő azonosítását is leírták már⁸⁶. Ennél fogva **az általam kimutatott mennyiségi változások fontos alapot biztosítanak további célzott vizsgálatoknak**, amelyek az általam előrejelzett potenciális biomarkerek validálására irányulnak.

Az egyik leggyakoribb PTM a glikoziláció, melynek egyik típusa a fehérjék és lineáris poliszacharidok kapcsolódásával létrejövő proteoglikánok keletkezése. A **proteoglikánok** megtalálhatók minden állati sejt felszínén, valamint nagy arányban fordulnak elő a sejteket körülvevő **extracelluláris mátrixban** is. Eredményeim alapján számos extracelluláris mátrix fehérje, köztük proteoglikán vázfehérjék mennyisége is szignifikánsan eltér a különböző mintacsoportokban (ld. 17. ábra), ami előrevetíti a fehérjékhez kapcsolódó szénhidrátláncok vizsgálatának szükségességét. Ezért kutatásom tervezett folytatása a proteoglikán vázfehérjékhez kapcsolódó glükózaminoglikán láncok részletes vizsgálata.

5. Összefoglalás

TDK munkám első lépésében a „*bottom-up*” proteomikai munkafolyamat egyik lépését, az emésztés során keletkező peptidek tisztítását vizsgáltam. Ehhez a különböző, laborunkban alkalmazott SPE állófázisokat és eljárásokat hasonlítottam össze egy általános összetételű proteomikai mintára és egy erősen glikozilált, hidrofíl mintára. A különböző módszereket az azonosítható peptidek és fehérjék számát tekintve hasonlítottam össze, valamint megvizsgáltam, hogy az adott módszer mutat-e szelektivitást a peptidhossz, a peptid hidrofobicitása vagy izoelektromos pontja szerint. Jelentős szelektivitást egyik eljárás esetén sem tapasztaltam.

A szokványos hidrofobicitás-eloszlású mintából **a legtöbb peptid és fehérje a C₁₈+TopTip kombinált eljárás alkalmazásával azonosítható**, az **egylépéses tisztítások közül pedig az egylépéses C₁₈ módszer használata tette lehetővé a legtöbb peptid és fehérje azonosítását**. A hidrofíl minta tisztítására az egylépéses C₁₈ módszer rendelkezett a legjobb teljesítményjellemzőkkel. Ezen hatékonysági, valamint az idő- és költséghatékonysági szempontokat figyelembe véve általánosan az egylépéses C₁₈ tisztítást találtam optimálisnak. A további kísérletekben emiatt ezt a módszert alkalmaztam a minták tisztítására.

Munkám második részében a nem kissejtes tüdőrák csoportjába tartozó, ALK génátrendeződést mutató tüdőszövetek vizsgálatával foglalkoztam. **ALK génátrendeződést mutató tüdőrák intratumorális heterogenitásának proteomikai karakterizálását legjobb tudomásom szerint a szakirodalomban ilyen részletességgel még nem vizsgálták**, ezért munkám hiánypótló jelleggel bír. Hét szövetmetszet összesen 23 régióját vizsgáltam meg triptikus emésztést követő nanoUHPLC-MS/MS mérésekkel. Ezután különböző szöveti régiókban található fehérjéket minőségi és mennyiségi szempontból jellemeztem a legkorszerűbb bioinformatikai és statisztikai módszerekkel. A vizsgált területek között többféle csoportosítást végeztem: összehasonlítottam az **eltérő patológiai besorolású** és a **mucintartalom** szempontjából különböző régiókat, továbbá megvizsgáltam az **eltérő stromatartalmú** szöveteket is.

Megállapítottam, hogy a különböző besorolású tumoros régiók között **szignifikánsan változó fehérjék jelentős része a fehérjeszintézis szabályozásában vesz részt**, ami arra utal, hogy a különböző típusú tumorokban a fehérjeszintézis szabályozása jelentősen különbözhet. Kimutattam, hogy a környező normál és az egyes tumoros mintacsoportok között szignifikánsan változó fehérjék olyan fontos biológiai folyamatokban vesznek részt, mint az

extracelluláris mátrix szerveződése, a hibásan feltekeredett fehérjékre adott sejtválasz kialakítása és a fehérjeszintézis.

Az egyes minták közti eltéréseket főkomponens-analízissel és hierarchikus klaszterezést követően hőtérkép készítésével vizsgáltam. Azt tapasztaltam, hogy **a környező normál minták a tumoros mintáktól minden esetben elkülönültek a főkomponens-analízis és a hierarchikus klaszterezés során.** A patológiai szempontból eltérő besorolású tumoros mintacsoportok közül a **szolid tumoros és a papilláris tumoros** csoportokba tartozó minták jelentős része **elkülönült** a főkomponens-analízis során, illetve **együtt klasztereződtek.**

Számos olyan, környező normál és tumoros mintákban szignifikánsan eltérő mennyiségben megtalálható **fehérjét azonosítottam, amelyek megfelelő biomarker jelöltek** lehetnek diagnosztikai célra történő alkalmazásra. Például az **ankirin-1 fehérje** mennyisége jelentősen csökkent, a mitokondriális **FAHD1 acilpiruváz** mennyisége viszont jelentősen nőtt a tumoros régiókban a nem tumoroshoz képest. Több olyan fehérjét is azonosítottam, ami a különböző tumoros állapotok között szignifikánsan eltérő mennyiségben van jelen, például a mucin-5B és az apolipoprotein L1.

Az általam kimutatott változások kiváló kiindulópontot biztosítanak további, célzott biomarker kutatásoknak, és lehetőséget teremthetnek új diagnosztikus vagy prognosztikus biomarkerek felfedezésére, így növelve a tüdőrákos betegek kezelésének hatékonyságát és gyógyulásuk valószínűségét.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni köszönetemet mindenkinek, aki hozzájárult e dolgozat létrejöttéhez.

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Turiák Lillának és Tóth Gábornak, hogy bevezettek a proteomika világába. Nagyra értékelem a rengeteg segítséget és támogatást, amit a gyakorlati munka és a dolgozat elkészítése során tőlük kaptam.

Köszönöm Dr. Szász A. Marcellnek, hogy a tüdő szövetmintákat rendelkezésünkre bocsátotta, és dolgozatom átnézésével jelentősen segítette annak biológiai szempontból való helyességét.

Köszönöm Dr. Drahos Lászlónak a dolgozat átnézését, Sugár Simonnak pedig a dolgozat átnézését és a statisztikai eredmények kiértékelésében nyújtott segítségét.

Hálás vagyok az MS Proteomika Kutatócsoport összes tagjának szakmai segítségükért és támogatásukért egyaránt.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy a dolgozat megírása alatt végig támogattak.

7. Irodalomjegyzék

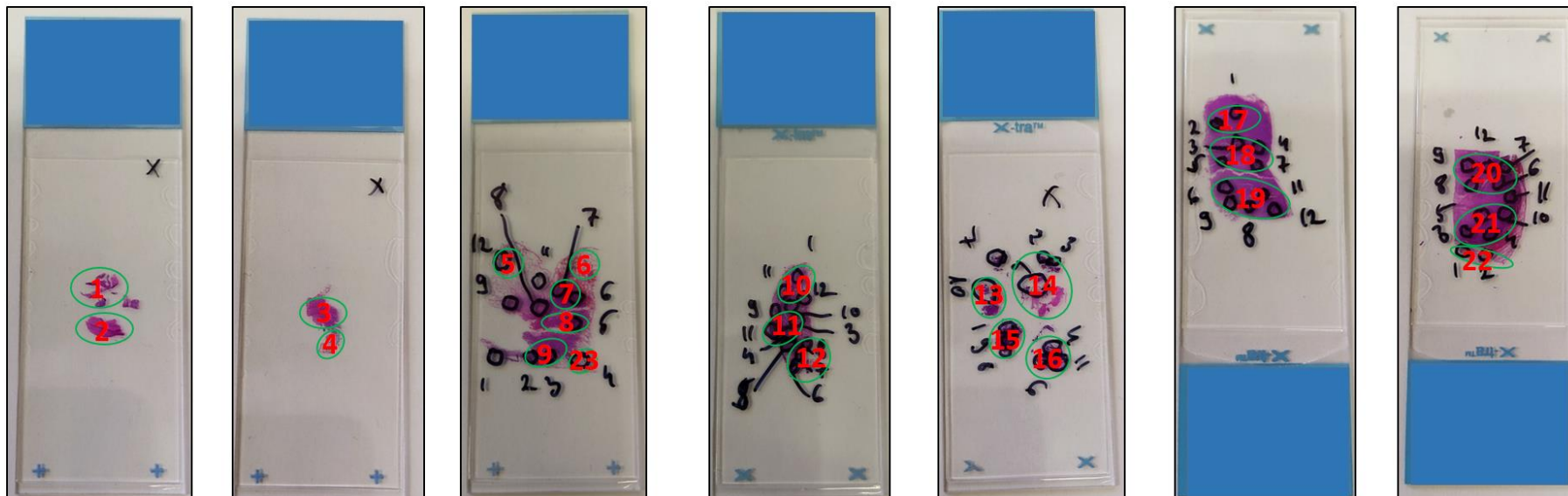
- 1 M, H. & RN, A. Changes in the Leading Cause of Death: Recent Patterns in Heart Disease and Cancer Mortality. *NCHS data brief* (2016).
- 2 MB, S. & ML, C. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **28**, doi:10.1158/1055-9965.EPI-19-0221 (2019).
- 3 J, E. *et al.* ALK inhibitors for non-small cell lung cancer: A systematic review and network meta-analysis. *PloS one* **15**, doi:10.1371/journal.pone.0229179 (2020).
- 4 Wang, M., Herbst, R. S. & Boshoff, C. Toward personalized treatment approaches for non-small-cell lung cancer. *Nature Medicine* **27**, 1345-1356, doi:10.1038/s41591-021-01450-2 (2021).
- 5 (IUPAC), T. I. U. o. P. a. A. C. The IUPAC Compendium of Chemical Terminology. (2021).
- 6 WC, C. Proteomics technologies and challenges. *Genomics, proteomics & bioinformatics* **5**, doi:10.1016/S1672-0229(07)60018-7 (2007).
- 7 Sowunmi, K. Proteomics. Importance for the Future of Genetics Research. (2021).
- 8 L, S., M, G. & WM, N. Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *Journal of proteome research* **12**, doi:10.1021/pr301201x (2013).
- 9 F, L. Introduction to proteomics. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **564**, doi:10.1007/978-1-60761-157-8_1 (2009).
- 10 Elsevier. Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics - 1st Edition. (2021).
- 11 RM, L. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical chemistry* **51**, doi:10.1373/clinchem.2005.051532 (2005).
- 12 S, H. Western blot analysis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **926**, doi:10.1007/978-1-62703-002-1_6 (2012).
- 13 A, K. *et al.* Proteomes, Their Compositions and Their Sources. *Advances in experimental medicine and biology* **919**, doi:10.1007/978-3-319-41448-5_1 (2016).
- 14 PE, G. *et al.* Plasma Proteome Profiling to Assess Human Health and Disease. *Cell systems* **2**, doi:10.1016/j.cels.2016.02.015 (2016).
- 15 KEJ, W., CE, T., PJ, V. & BM, T. Cerebrospinal fluid proteomics and biological heterogeneity in Alzheimer's disease: A literature review. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* **57**, doi:10.1080/10408363.2019.1670613 (2020).
- 16 A, C. & FM, B. Proteomics Analysis of Colorectal Cancer Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1765**, doi:10.1007/978-1-4939-7765-9_9 (2018).
- 17 IC, G. & O, K. Application of mass spectrometry in proteomics. *Bioscience reports* **25**, doi:10.1007/s10540-005-2849-x (2005).
- 18 M, K., U, B. & T, D. Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine. *Fresenius' journal of analytical chemistry* **366**, doi:10.1007/s002160051561 (2000).
- 19 Coon, J. J., Syka, J. E. P., Shabanowitz, J. & Hunt, D. F. Tandem Mass Spectrometry for Peptide and Protein Sequence Analysis. doi:10.2144/05384TE01 (2018).
- 20 BT, C. Chemistry. Mass spectrometry: bottom-up or top-down? *Science (New York, N.Y.)* **314**, doi:10.1126/science.1133987 (2006).
- 21 JM, W. & SA, M. Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. *Methods in enzymology* **402**, doi:10.1016/S0076-6879(05)02005-7 (2005).
- 22 NL, K. Top-down proteomics. *Analytical chemistry* **76** (2004).
- 23 Pandeswari, P. B. & Sabareesh, V. Middle-down approach: a choice to sequence and characterize proteins/proteomes by mass spectrometry. doi:10.1039/C8RA07200K (2019).
- 24 S, G., PP, T., Z, H., MF, M. & B, M. Data Dependent-Independent Acquisition (DDIA) Proteomics. *Journal of proteome research* **19**, doi:10.1021/acs.jproteome.0c00186 (2020).
- 25 Marquioni, V., Nunes, F. M. F. & Novo-Mansur, M. T. M. Protein Identification by Database Searching of Mass Spectrometry Data in the Teaching of Proteomics. doi:10.1021/acs.jchemed.0c00853 (2021).

- 26 G, Z. *et al.* Protein quantitation using mass spectrometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **673**, doi:10.1007/978-1-60761-842-3_13 (2010).
- 27 M, B., M, S., G, S., J, R. & B, K. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry* **389**, doi:10.1007/s00216-007-1486-6 (2007).
- 28 TM, A. Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical chemistry* **49**, doi:10.1373/49.7.1041 (2003).
- 29 MR, B. & YE, v. d. B. Solid-phase extraction strategies to surmount body fluid sample complexity in high-throughput mass spectrometry-based proteomics. *Journal of analytical methods in chemistry* **2015**, doi:10.1155/2015/250131 (2015).
- 30 Buszewski, B. & Szultka, M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **42**, doi:10.1080/07373937.2011.645413 (2012).
- 31 J, K. & RF, D. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology* **157**, doi:10.1016/0022-2836(82)90515-0 (1982).
- 32 L, P. *et al.* Enrichments of post-translational modifications in proteomic studies. *Journal of separation science* **43**, doi:10.1002/jssc.201900804 (2020).
- 33 CW, C., CL, C. & SF, C. Evaluation of peptide fractionation strategies used in proteome analysis. *Journal of separation science* **35**, doi:10.1002/jssc.201200631 (2012).
- 34 T, S., E, V., I, S. & G, H. Comparison of fractionation strategies for offline two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of proteins from mouse adipose tissue. *Analytical biochemistry* **484**, doi:10.1016/j.ab.2015.05.015 (2015).
- 35 Q, Z. *et al.* Prefractionation and separation by C8 stationary phase: effective strategies for integral membrane proteins analysis. *Talanta* **88**, doi:10.1016/j.talanta.2011.11.035 (2012).
- 36 RM, T., PR, H. & JP, Q. Sample Clean-up Strategies for ESI Mass Spectrometry Applications in Bottom-up Proteomics: Trends from 2012 to 2016. *Proteomics* **17**, doi:10.1002/pmic.201700011 (2017).
- 37 A, A. *et al.* Impact of sample preparation in peptide/protein profiling in human serum by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **46**, doi:10.1016/j.jpba.2007.10.015 (2008).
- 38 PH, J., S, M., P, H. & ON, J. Glycopeptide enrichment for MALDI-TOF mass spectrometry analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography solid phase extraction (HILIC SPE). *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **951**, doi:10.1007/978-1-62703-146-2_10 (2013).
- 39 LG, Z. *et al.* HILIC and ERLIC Enrichment of Glycopeptides Derived from Breast and Brain Cancer Cells. *Journal of proteome research* **15**, doi:10.1021/acs.jproteome.6b00429 (2016).
- 40 R, K. *et al.* Distinct urinary glycoprotein signatures in prostate cancer patients. *Oncotarget* **9**, doi:10.18632/oncotarget.26005 (2018).
- 41 MR, L., ME, G., PJ, R. & P, R. Improved detection of hydrophilic phosphopeptides using graphite powder microcolumns and mass spectrometry: evidence for in vivo doubly phosphorylated dynamin I and dynamin III. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **3**, doi:10.1074/mcp.M300105-MCP200 (2004).
- 42 S, P. *et al.* New Magnetic Graphitized Carbon Black TiO₂ Composite for Phosphopeptide Selective Enrichment in Shotgun Phosphoproteomics. *Analytical chemistry* **88**, doi:10.1021/acs.analchem.6b02345 (2016).
- 43 ML, d. L. *et al.* Glycomic approach for potential biomarkers on prostate cancer: profiling of N-linked glycans in human sera and pRNS cell lines. *Disease markers* **25**, doi:10.1155/2008/515318 (2008).
- 44 G, T. *et al.* Salt gradient chromatographic separation of chondroitin sulfate disaccharides. *Journal of chromatography. A* **1619**, doi:10.1016/j.chroma.2020.460979 (2020).
- 45 PH, J., NG, K., D, K. & NH, P. Structural analysis of N- and O-glycans released from glycoproteins. *Nature protocols* **7**, doi:10.1038/nprot.2012.063 (2012).
- 46 A, H. *et al.* Combined solid-phase extraction and 2D LC-MS for characterization of the neuropeptides in rat-brain tissue. *Analytical and bioanalytical chemistry* **382**, doi:10.1007/s00216-005-3146-z (2005).
- 47 K, Z. From purification of large amounts of phospho-compounds (nucleotides) to enrichment of phospho-peptides using anion-exchanging resin. *Analytical biochemistry* **357**, doi:10.1016/j.ab.2006.07.001 (2006).

- 48 M, S., CT, M. & RS, H. Effect of anionic ion-pairing reagent concentration (1-60 mM) on reversed-phase liquid chromatography elution behaviour of peptides. *Journal of chromatography. A* **1080**, doi:10.1016/j.chroma.2005.02.047 (2005).
- 49 M, S., CT, M. & RS, H. Effect of anionic ion-pairing reagent hydrophobicity on selectivity of peptide separations by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of chromatography. A* **1080**, doi:10.1016/j.chroma.2005.03.035 (2005).
- 50 C, W., C, E. & M, L. Porous graphitic carbon: a versatile stationary phase for liquid chromatography. *Journal of chromatography. A* **1217**, doi:10.1016/j.chroma.2009.09.052 (2010).
- 51 MH, S., M, H., AM, D. & M, W. Cotton HILIC SPE microtips for microscale purification and enrichment of glycans and glycopeptides. *Analytical chemistry* **83**, doi:10.1021/ac1027116 (2011).
- 52 N, B. & M, A. Small Cell Lung Cancer. (2021).
- 53 DJ, T., BC, T., BG, A. & CR, K. Surgery versus stereotactic body radiation therapy for stage I non-small cell lung cancer: A comprehensive review. *Cancer* **124**, doi:10.1002/cncr.31196 (2018).
- 54 S, L., L, F.-C., F, D., N, G. & A, M. New molecular classification of large cell neuroendocrine carcinoma and small cell lung carcinoma with potential therapeutic impacts. *Translational lung cancer research* **9**, doi:10.21037/tlcr-20-269 (2020).
- 55 EN, I., AG, I. & EV, L. Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current status and perspectives. *Critical reviews in oncology/hematology* **157**, doi:10.1016/j.critrevonc.2020.103194 (2021).
- 56 Y, H., D, L. & L, L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American journal of cancer research* **10** (2020).
- 57 EC, N., JK, D. & PK, C. Targeted Therapy and Immunotherapy for Lung Cancer. *Surgical oncology clinics of North America* **25**, doi:10.1016/j.soc.2016.02.011 (2016).
- 58 AT, S. & JA, E. ALK in lung cancer: past, present, and future. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**, doi:10.1200/JCO.2012.44.5353 (2013).
- 59 J, B. & JA, S. Fluorescence in situ Hybridization (FISH). *Current protocols in cell biology* **Chapter 22**, doi:10.1002/0471143030.cb2204s23 (2004).
- 60 PP, L., CI, S., A, M. & WA, C. Biomarkers for ALK and ROS1 in Lung Cancer: Immunohistochemistry and Fluorescent In Situ Hybridization. *Archives of pathology & laboratory medicine* **142**, doi:10.5858/arpa.2017-0502-RA (2018).
- 61 L, T. *et al.* Workflow for combined proteomics and glycomics profiling from histological tissues. *Analytical chemistry* **86**, doi:10.1021/ac5022216 (2014).
- 62 E, K. *et al.* Adenocarcinoma classification: patterns and prognosis. *Pathologica* **110** (2018).
- 63 S, N. & V, M. Mucinous Tubular and Spindle Cell Carcinoma: A Review of Histopathology and Clinical and Prognostic Implications. *Archives of pathology & laboratory medicine* **144**, doi:10.5858/arpa.2017-0506-RS (2020).
- 64 F, M., G, L., B, M. & D, M. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Current topics in developmental biology* **80**, doi:10.1016/S0070-2153(07)80006-8 (2008).
- 65 Y, N. MUC1 and colorectal cancer pathophysiology considerations. *World journal of gastroenterology* **14**, doi:10.3748/wjg.14.2139 (2008).
- 66 F, B. *et al.* Tumor-stroma interactions in tumorigenesis: lessons from stem cell biology. *Frontiers in bioscience (Elite edition)* **4**, doi:10.2741/509 (2012).
- 67 E, T. *et al.* HPLC enrichment/isolation of proteins for post-translational modification studies from complex mixtures. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **98**, doi:10.1016/j.jpba.2014.06.025 (2014).
- 68 RE, C. Deparaffinization and processing of pathologic material. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **115**, doi:10.1385/1-59259-213-9:275 (1999).
- 69 SR, S., RJ, C. & CR, T. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **49**, doi:10.1177/002215540104900801 (2001).

- 70 L, T. *et al.* High sensitivity proteomics of prostate cancer tissue microarrays to discriminate between healthy and cancerous tissue. *Journal of proteomics* **197**, doi:10.1016/j.jprot.2018.11.009 (2019).
- 71 M, B., YJ, K. & C, B. Byonic: advanced peptide and protein identification software. *Current protocols in bioinformatics* **Chapter 13**, doi:10.1002/0471250953.bi1320s40 (2012).
- 72 ExPASy - Compute pI/Mw tool, <https://web.expasy.org/compute_pi/> (2021).
- 73 BC, S. Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies. *Proteomics* **10**, doi:10.1002/pmic.200900437 (2010).
- 74 S, T., T, T. & J, C. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature protocols* **11**, doi:10.1038/nprot.2016.136 (2016).
- 75 SH, Y. *et al.* Expanding the Perseus Software for Omics Data Analysis With Custom Plugins. *Current protocols in bioinformatics* **71**, doi:10.1002/cpbi.105 (2020).
- 76 D, S. *et al.* The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic acids research* **45**, doi:10.1093/nar/gkw937 (2017).
- 77 H, Q. *et al.* RNA-binding proteins in tumor progression. *Journal of hematology & oncology* **13**, doi:10.1186/s13045-020-00927-w (2020).
- 78 S, N., JP, H. & DJ, C. The Role of the Extracellular Matrix in Cancer Stemness. *Frontiers in cell and developmental biology* **7**, doi:10.3389/fcell.2019.00086 (2019).
- 79 A, S. Retrograde traffic from the Golgi to the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**, doi:10.1101/cshperspect.a013391 (2013).
- 80 E, M., SE, L., SJ, H., S, M. & A, S. The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance. *Biology of the cell* **111**, doi:10.1111/boc.201800050 (2019).
- 81 N, N. *et al.* Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Molecular systems biology* **7**, doi:10.1038/msb.2011.81 (2011).
- 82 S, D., F, G. & M, M. The Case for Proteomics and Phospho-Proteomics in Personalized Cancer Medicine. *Proteomics. Clinical applications* **13**, doi:10.1002/prca.201800113 (2019).
- 83 V, B. & AJ, B. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiological reviews* **81**, doi:10.1152/physrev.2001.81.3.1353 (2001).
- 84 S, K. *et al.* Utility of ankyrin 3 as a prognostic marker in androgen-receptor-positive breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **176**, doi:10.1007/s10549-019-05216-w (2019).
- 85 H, P. *et al.* Identification of human fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 1 (FAHD1) as a novel mitochondrial acylpyruvase. *The Journal of biological chemistry* **286**, doi:10.1074/jbc.M111.264770 (2011).
- 86 *The Human Protein Atlas*, <<https://www.proteinatlas.org/>> (2021).

8. Függelék



F1. ábra. A vizsgált tüdőmetszetek H&E festett képe és a szöveti régiók számozása.

F1. táblázat. A vizsgált proteomikai régiók jellemzése patológia, mucintartalom és stromatartalom szerint. A mucin és stromatartalomnál szereplő számozás jelentése: 0 – nincs, 1 – enyhe, 2 – közepes, 3 – erős.

Proteomikai régió sorszáma	Patológia	Mucin (1-3)	Stroma (1-3)
1	tubuláris	3	3
2	tubuláris	3	3
3	szolid	2	2
4	normál (tüdő)		
5	normál (tüdő)		
6	normál (tüdő)		
7	tubuláris	2	1
8	papilláris	2	1
9	papilláris	2	3
10	papilláris	3	2
11	papilláris	3	3
12	papilláris	3	2
13	szolid	0	2
14	szolid	0	2
15	szolid	0	3
16	szolid	0	0
17	szolid	0	1
18	szolid	0	1
19	szolid	0	1
20	szolid	1	3
21	szolid	0	3
22	normál (tüdő)		
23	normál (zsírszövet)		

F2. táblázat. A MaxQuant programban fehérjék mennyiségi meghatározásához használt beállítások.

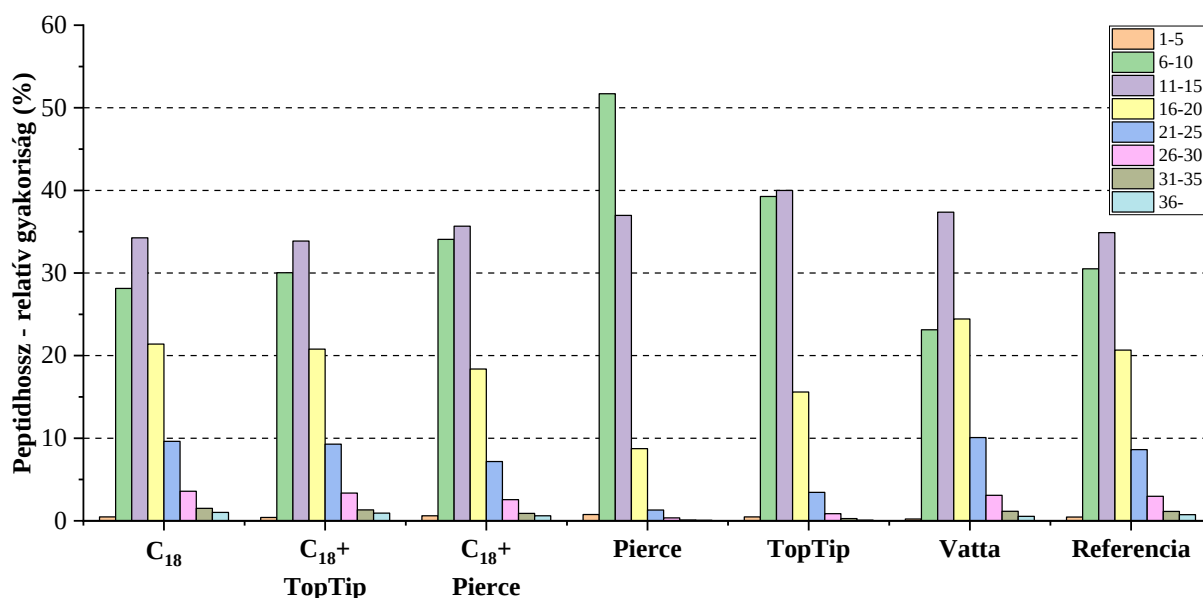
Keresési tér	HeLa: kutatócsoportban összeállított HeLa adatbázis vérplazma: Swissprot humán adatbázis tüdőminták: Byonic-kal azonosított fehérjékből készített adatbázis
Mennyiségi meghatározás	LFQ
Minimális peptidszám LFQ arány számításhoz	2
Készülék típusa	Bruker Q-TOF
Peptid tolerancia az első keresés során	20 ppm
Peptid tolerancia a fő keresés során	10 ppm
Maximális töltés	4
MS1 intenzitásküszöb	30
MS/MS intenzitásküszöb	30
Emésztés	tripszin
Kihagyott hasítási helyek maximális száma	2
Variábilis módosulások	oxidáció (M), deamidáció (NQ)
Fix módosulások	karbamidometil (C)
Minimum peptidhossz	7
Maximális peptid tömeg	4600 Da
Azonosítás	„Match between runs” (jelentése: két mérés között akkor is párosítva lesznek az egy peptidhez tartozó jelek, ha csak az egyik esetben történt meg az azonosítás MS/MS alapján)
Minimum peptidek száma	2
Minimum egyedi peptidek száma	1

F3. táblázat. A Perseus szoftverrel történő értékelés lépései és az alkalmazott beállítások két, illetve kettőnél több mintacsoport esetén.

	Két mintacsoport esetén	Kettőnél több mintacsoport esetén
1.	Fordított fehérjetalálatok és potenciális szennyezők eltávolítása	
2.	Minták csoportosítása az aktuális szempont szerint	
3.	Adatok szűrése: csak azokkal a fehérjékkel foglalkoztam, melyek legalább egy mintacsoportban, legalább a minták felében azonosíthatók és kvantifikálhatók voltak (nem 0 érték tartozik hozzá).	
4.	Log(2) transzformáció	
5.	Hiányzó értékek imputálása Főkomponens-analízishez az így kapott mátrixot használtam.	
6.	Statisztikai tesztek elvégzése	
	A két csoport közti szignifikáns különbségeket Student-féle t-teszttel mutattam ki. (S0 = 0, kétoldali t-teszt)	ANOVA varianciaanalízis (S0 = 0, Benjamini-Hochberg FDR, FDR = 0,05)
		Adatok szűrése: csak az ANOVA szignifikáns fehérjéket tartottam meg. A hierarchikus klaszterezéshez, majd a hőtérkép készítéséhez ezt a mátrixot használtam.
		Post-hoc Tukey-teszt (FDR = 0,05)

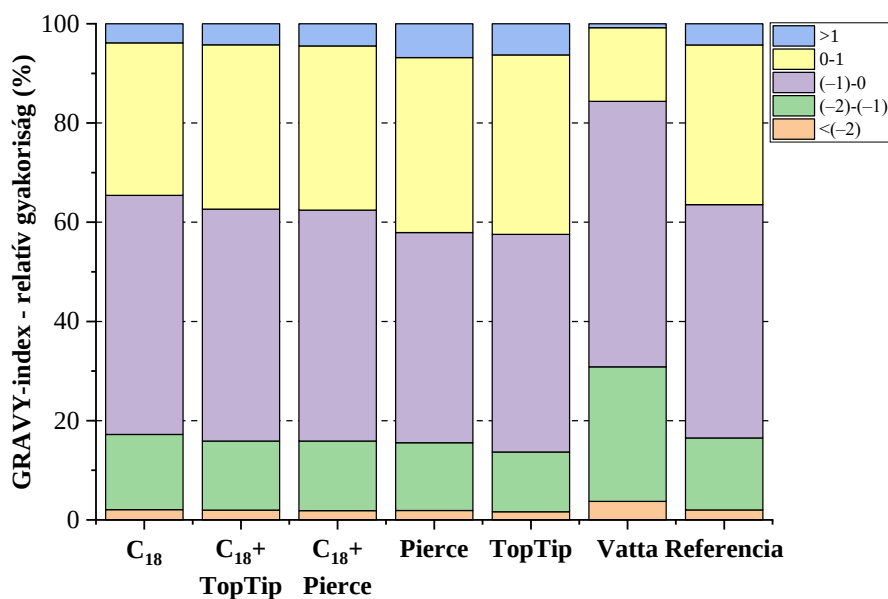
F1. Szelektivitás vizsgálata szokványos hidrofobitás-eloszlású proteomikai minták tisztítása esetén

A peptidhosszakat tekintve (F2. ábra) megállapítható, hogy elsősorban a Pierce, kisebb mértékben pedig a TopTip is szelektivitást mutat a rövidebb peptidekre, ugyanis ezen módszerek alkalmazása esetén relatíve több a rövid peptid, mint a referenciában. Ezzel szemben a vatta, és kismértékben a C₁₈ eljárás használata is több hosszabb peptidet eredményez. A kétlépéses eljárásoknál a két lépés ellentétes irányba tolja el az átlagos peptidhosszt: a C₁₈ növeli, a második lépés pedig csökkenti azt. A két hatás eredőjeként a C₁₈+Pierce módszer esetén több rövidebb peptid azonosítható, mint a referenciában; a C₁₈+TopTip alkalmazása pedig a referenciához nagyon hasonló eloszlást mutat. Az SPE tisztítás során a célunk az, hogy a minta összetétele ne változzon meg. **Peptidhossz tekintetében ezt a követelményt a C₁₈+TopTip kombinált eljárás teljesíti a legjobban.**



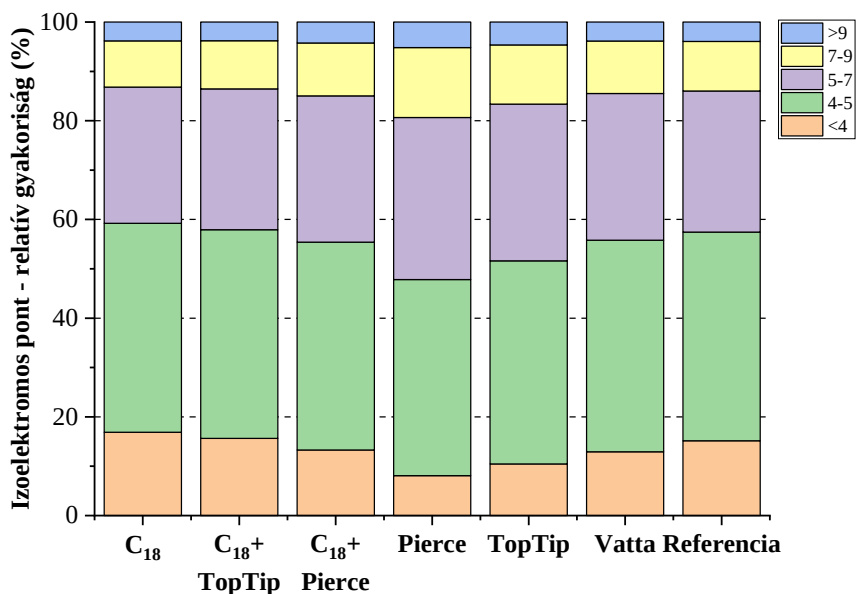
F2. ábra. HeLa peptidek peptidhossz szerinti eloszlása hat különböző SPE tisztítás és a referencia esetén.

A **GRAVY-indexeket** összevetve (F3. ábra) megállapítható, hogy **a referenciára leginkább a C₁₈+TopTip és C₁₈+Pierce kombinált módszerek mintázata hasonlít**, míg a Pierce és a TopTip több pozitív GRAVY-indexszel rendelkező, azaz hidrofób peptidet eredményez, a C₁₈ eljárás alkalmazása viszont kismértékben a hidrofil peptideket dúsítja fel. A vatta használata esetén a hidrofil peptidek feldúsulása sokkal nagyobb mértékű. Ez azt bizonyítja, hogy a vatta, mint SPE állófázis alkalmasabb lehet hidrofil vegyületek, pl. glikopeptidek dúsítására és szelektív kinyerésére, mint a többi vizsgált módszer.



F3. ábra. HeLa peptidek GRAVY-index szerinti eloszlása hat különböző SPE tisztítás és a referencia esetén.

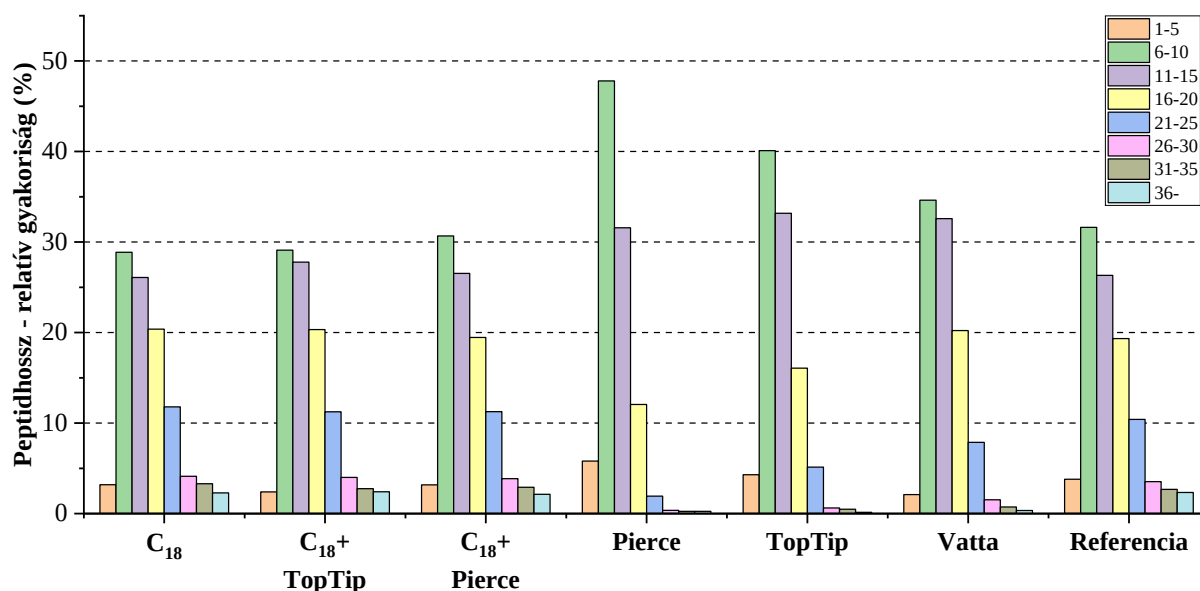
Végül a peptidek **izoelektromos pont eloszlását** megfigyelve (F4. ábra) elmondható, hogy a Pierce, a TopTip és a vatta a bázikus peptidekre mutat némi szelektivitást, a C₁₈ tisztítás használata pedig a savas peptideket dúsítja fel kismértékben. A kombinált módszerek közül a C₁₈+Pierce esetén a referenciánál több bázikus peptidet tartalmazó mintát kapunk, a **C₁₈+TopTip alkalmazása viszont a referenciához nagyon hasonló összetételű peptidkeveréket eredményez.**



F4. ábra. HeLa peptidek izoelektromos pont szerinti eloszlása hat különböző SPE tisztítás és a referencia esetén.

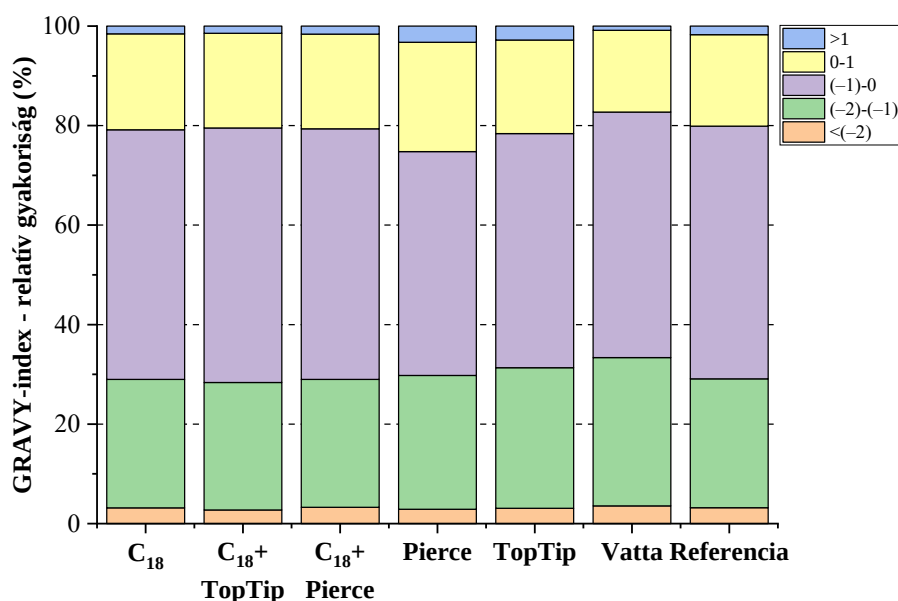
F2. Szelektivitás vizsgálata hidrofil minták tisztítása esetén

A peptidhossz tekintetében (F5. ábra) megfigyelhető, hogy elsősorban a Pierce, kisebb mértékben pedig a TopTip és a vatta is dúsította a mintát a rövidebb peptidekre nézve a referenciához képest. Ezzel szemben a C₁₈ és a C₁₈ alapú kombinált módszerek alkalmazása után kapott minták több hosszú peptidet és kevesebb rövid peptidet tartalmaztak, mint a referencia (gyártói C₁₈ eljárás).



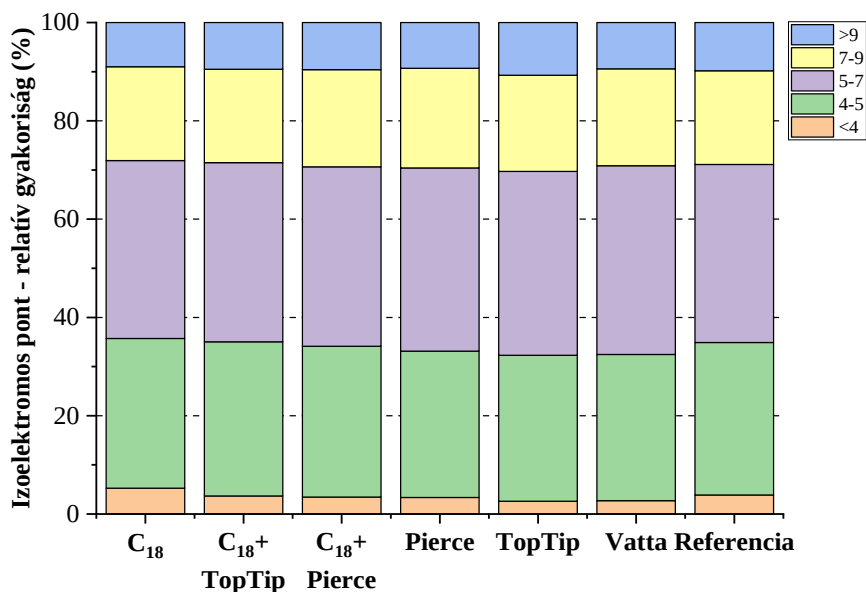
F5. ábra. Vérplazma frakció peptidjeinek peptidhossz szerinti eloszlása hét különböző SPE tisztítás esetén.

A vizsgált vegyület polaritását leíró **GRAVY-index** esetén a **C₁₈ alapú módszerek (beleértve a referenciát is) hasonló eloszlást mutattak (F6. ábra)**. Ehhez képest főleg a Pierce, de kisebb mértékben a TopTip módszer alkalmazása esetén is nagyobb veszteségeket tapasztaltunk a közepes polaritású komponensekből, míg a hidrofil és hidrofób peptidek feldúsultak a mintában. A vatta ezzel szemben a hidrofil, negatív GRAVY-indexszel rendelkező peptidek visszanyerését segítette elő a hidrofil mintából is, ugyanúgy, mint a HeLa esetén, bár itt az eltérés kevésbé volt jelentős.

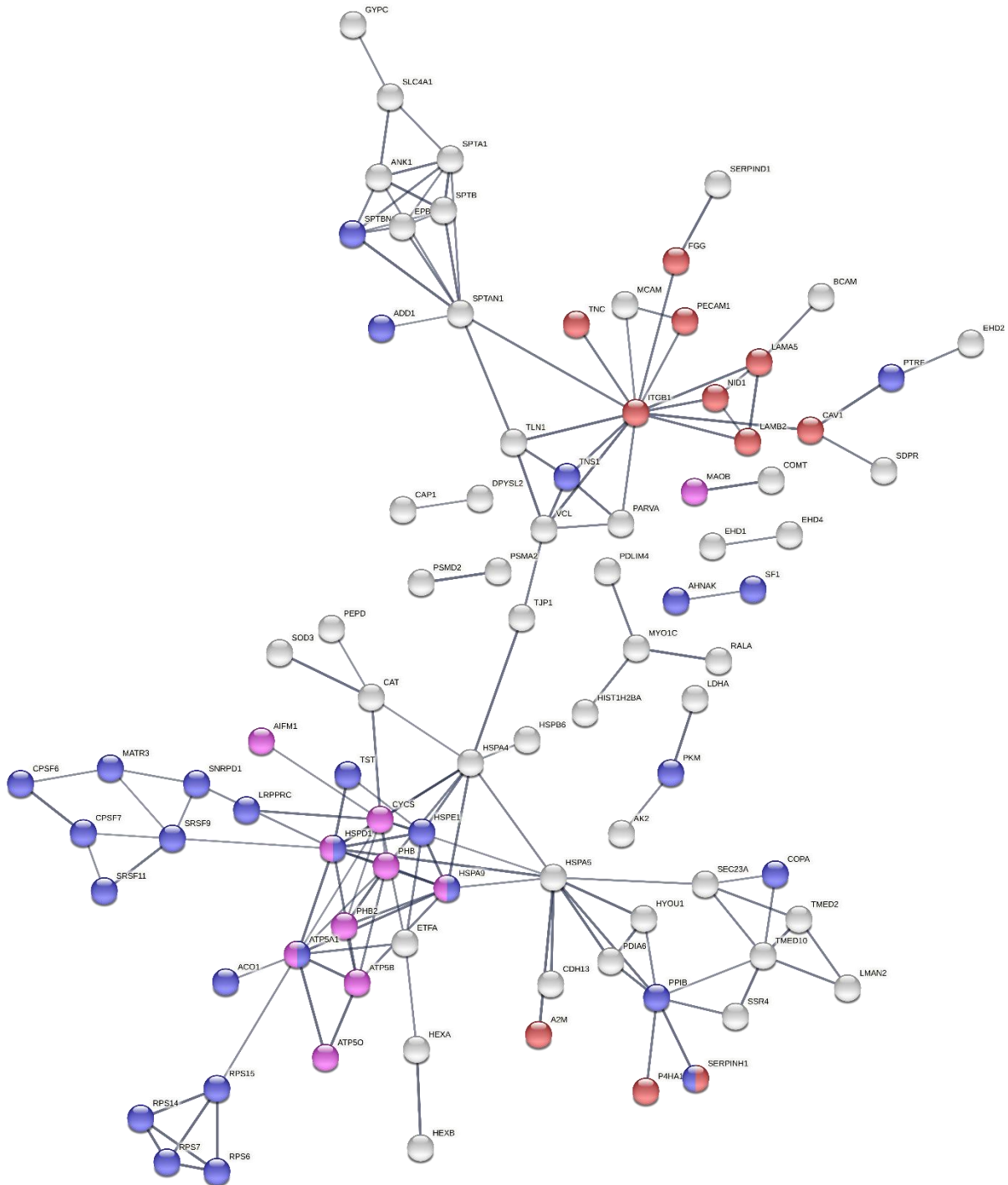


F6. ábra. Vérplazma frakció peptidjeinek GRAVY-index szerinti eloszlása hét különböző SPE tisztítás esetén.

Az izoelektromos pont tekintetében (F7. ábra) az összes eljárás alkalmazása nagyon hasonló eloszlást eredményezett, köztük csak apró eltérések figyelhetők meg. Az egyik ilyen különbség, hogy a TopTip tisztítás kismértékben több lúgos, a vatta alkalmazása pedig több enyhén savas komponens azonosítását tette lehetővé, és mindkét módszer az erősebben savas komponensek nagyobb részét veszi el, mint a referencia (gyártói C₁₈ eljárás). A referencia által mutatott eloszláshoz legjobban a C₁₈+TopTip mintázata hasonlított.

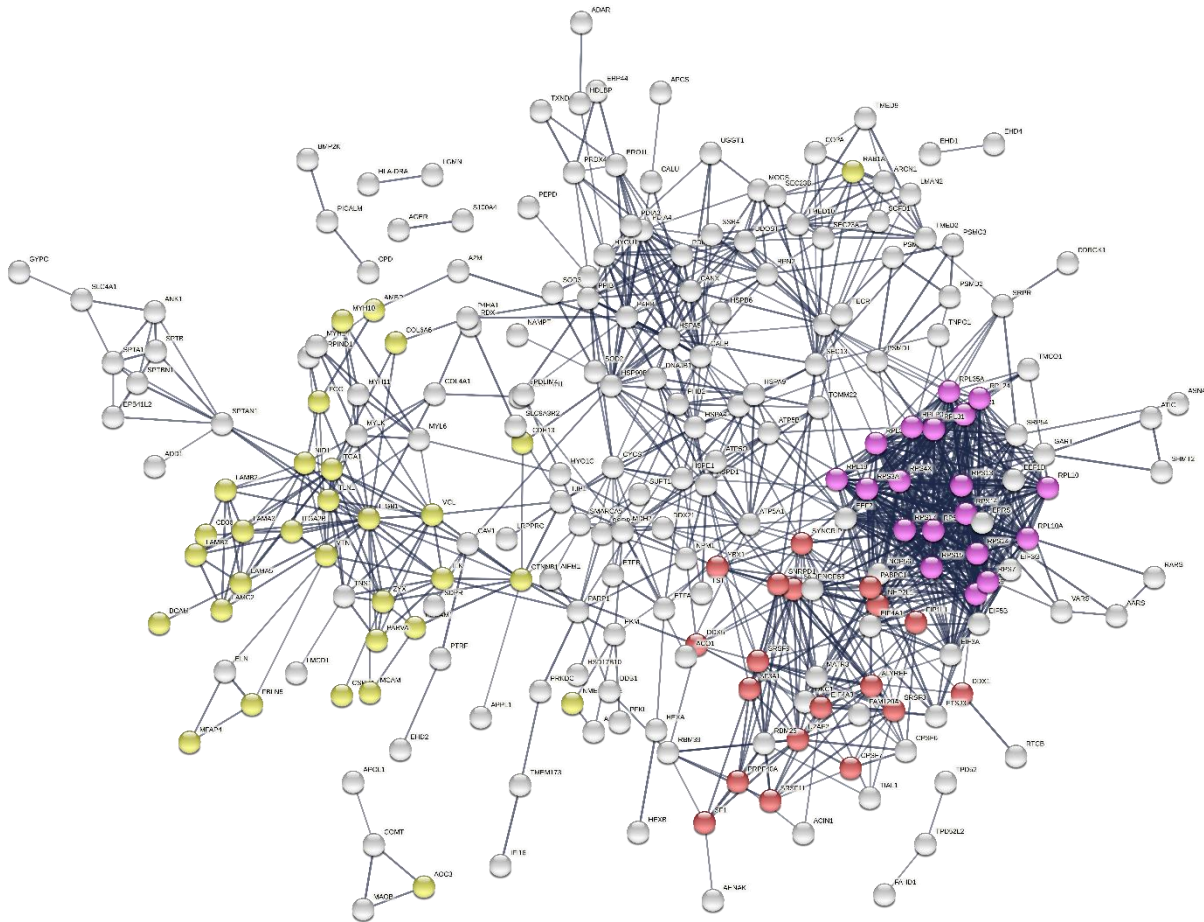


F7. ábra. Vérplazma frakció peptidjeinek izoelektromos pont szerinti eloszlása hét különböző SPE tisztítás esetén.



F8. ábra. A környező normál és a tubuláris tumor között szignifikánsan változó fehérjékre épített fehérje interakciós hálózat.

Jelmagyarázat: *kék: RNS kötő fehérje, piros: extracelluláris mátrix szerveződésében szerepet játszó fehérje, rózsaszín: mitokondriális membránfehérje.*



F9. ábra. A környező normál és a szolid tumor között szignifikánsan változó fehérjékre épített fehérje interakciós hálózat.

Jelmagyarázat: **piros:** mRNS „splicing”-ban, **sárga:** sejttadhézióban szerepet játszó fehérje, **rózsaszín:** riboszóma szerkezeti eleme.