

szerkesztette

Dr. CSŐSZ ÉVA

# BEVEZETÉS A PROTEOMIKÁBA

/ a fehérjék korszerű vizsgálata



Semmelweis Kiadó

**Ha még nincs ismereted a proteomikáról, de érdekesnek hangzik, vagy most kerültél be egy proteomika laboratóriumba, netán ott szeretnél dolgozni, vagy ha csak egyszerűen olyan kísérletet tervezel, amelyhez segítség lehet a proteomika gazdag tárháza és az általa biztosított nagy mennyiségű adat, akkor megtaláltad a megfelelő könyvet.**

## / k ö n y v i s m e r t e t ő

Ez a könyv tudósok által írt és tudományos igényességgel született, de nem kifejezetten tudományos könyv. Nem is igazán ismeretterjesztő, de jelentős mennyiségű ismeretet tartalmaz. Nem kimondott tankönyv, de bízunk benne, hogy az érdeklődők sokat tanulhatnak belőle. Ugyanakkor kapcsolatteremtő, ún. „interfész” az érdeklődő olvasó és a bemutatott módszereket napi szinten használó hazai laboratóriumokban dolgozó kutatók között. Vagyis, ez egy rendhagyó könyv, amely hiánypótló és egyedi a maga nemében.

A célunk az volt, hogy egy olyan könyvet készítsünk magyar nyelven, amelyből a proteomika iránt érdeklődő képet kaphat a proteomika alapvető kérdéseiről és kihívásairól, információhoz juthat az egyes főbb proteomikai módszereket illetően, vagy elindulhat a proteomikai kutatások kihívásokkal teli, de jelentős eredményekkel kecsegtető útján. Az egyes fejezetekben közérthető módon és szemléletesen próbáltuk a legfontosabbnak ítélt témaköröket bemutatni, alapismereteket nyújtva az érdeklődőknek, és irányt mutatva az elmélyülni vágyóknak.

Az érdeklődőknek használható ismereteket kívánunk adni és nem elméleti eszmefuttatásokkal untatni. Az egyes módszereknél bemutatott előnyök és hátrányok a hazai proteomikai laboratóriumokban dolgozó kollégák több éves tapasztalatán átszűrve, a mindennapokban használható hasznos tudássá sűrítve kerülnek bemutatásra. A felvetett problémák nem arra hivatottak, hogy eltántorítsák az olvasót, hanem reményeink szerint segítséget nyújtanak a körültekintő kísérlettervezésnél és az elengedhetetlen kritikus gondolkodásra bátorítanak.

A könyv szakmai háttérét a hazánkban működő hét proteomikai laboratóriumban dolgozó, több éves tapasztalattal rendelkező kollégák biztosítják, akik partnerek az egyes módszerek továbbgondolásában és kivitelezésében. Jó olvasást és jó gondolkodást kívánunk!

*(a szerkesztő és a szerzők)*



**Csősz Éva** biológus diplomáit a kolozsvári Babes-Bolyai Tudományegyetemen és a Debreceni Egyetemen szerezte. Doktori tanulmányait a Debreceni Egyetemen végezte Fésüs László akadémikus irányításával. A posztdoktori évek alatt került kapcsolatba a proteomikával. Ma a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetének professzora, számos biokémia és proteomika tárgyú kurzus oktatója, valamint a Biomarker kutatócsoport vezetője. Oktatási és kutatási tevékenységén kívül jelentős tudományos közéleti tevékenységet is végez: a Magyar Biokémiai Egyesület (MBKE) Proteomika Szakosztályának az elnöke, a MBKE Intézőbizottságának a tagja, az Európai Proteomikai Társaság (EuPA) vezetőségi tagja, valamint részt vesz a legnagyobb proteomikai világszervezet, a HUPO (Human Proteome Organization) vezetésében. Ezen kívül szerepet vállal a kutatói utánpótlás képzésében és lelkes hirdetője annak az elvnek, hogy örömmel, jókedvvel és alázatos rácsodálkozással érdemes gazdagítani ismereteinket, tágítani tudásunk határát.

# BEVEZETÉS A PROTEOMIKÁBA

– a fehérjék korszerű vizsgálata –

---

szerkesztette: **Dr. Csősz Éva**

Semmelweis Kiadó

B u d a p e s t , 2 0 2 3

A könyv (MEC\_K 140744 kódszámú projekt) az Innovációs és Technológiai Minisztérium által a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal útján meghirdetett Mecenatúra – MEC\_21 azonosítószámú „Tudományos Mecenatúra Pályázat” finanszírozásában valósult meg.



A könyvet lektorálta

**Prof. Dr. Prókai László,**

Robert A. Welch Chair in Biochemistry, Department of Pharmacology and Neuroscience, The University of North Texas Health Science Center at Fort Worth

© Prof. Dr. Csősz Éva, 2023

**e-ISBN 978-963-331-600-9**

Az e-könyv alapja az ugyanezen címmel, 2023-ban megjelent hagyományos könyv (ISBN 978-963-331-599-6)

**Semmelweis Kiadó**

1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.

**[www.semmelweiskiado.hu](http://www.semmelweiskiado.hu)**

A könyv/e-könyv szerzői jogi oltalom és kizárólagos kiadói felhasználási jog alatt áll. Bármely részének vagy egészének mindennemű többszörözése kizárólag a szerkesztő, a szerzők, a grafikus és a kiadó előzetes írásbeli engedélye alapján jogszerű.

Felelős kiadó: Szabó György

Felelős szerkesztő: dr. Vincze Judit

Tördelőszerkesztő: Ángyán Gergő

© *Illusztráció: Ángyán Gergő*

© *Borító: Ángyán Gergő*

SKD 764



**A könyv szerkesztője:**

**Prof. Dr. Csősz Éva**, egyetemi tanár, intézetvezető-helyettes,  
Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biokémiai és Molekuláris Biológiai  
Intézet

**Írták:**

**Prof. Dr. Csősz Éva**, egyetemi tanár, intézetvezető-helyettes,  
Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biokémiai és Molekuláris Biológiai  
Intézet

**Dr. Darula Zsuzsanna**, tudományos főmunkatárs,  
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Proteomikai Kutatócsoport,  
Egyesített Omikák Műszerközpont, Magyar Molekuláris Medicina Kiválósági Központ  
(HCEMM)

**Dr. Drahos László**, tudományos főmunkatárs,  
HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont, MS Proteomika Kutatócsoport

**Dr. Emri Miklós**, egyetemi docens,  
Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Képző Intézet, Nukleáris  
Medicina Tanszék

**Dr. Hunyadi-Gulyás Éva**, tudományos főmunkatárs,  
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Proteomikai Kutatócsoport

**Prof. Dr. Janáky Tamás**, egyetemi tanár,  
Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani  
Intézet

**Dr. Juhász Gábor**, tudományos tanácsadó,  
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, Proteomikai  
Laboratórium

**Dr. Kalló Gergő**, egyetemi adjunktus,  
Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar,  
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet

**Dr. Kékesi Adrienna Katalin**, egyetemi docens,  
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, Élettani és  
Neurobiológiai Tanszék, Proteomikai Laboratórium

**Dr. Klement Éva**, tudományos munkatárs,  
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Proteomikai Kutatócsoport

**Dr. Márk László**, egyetemi docens, tanszékvezető,  
Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

**Dr. Medzihradsky F. Katalin**, konzulens,  
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Proteomikai Kutatócsoport,  
Adjunct Professor of Pharmaceutical Chemistry, Pharm. Chem. Department, School of  
Pharmacy, University of California San Francisco

**Dr. Pettkő-Szandtner Aladár**, tudományos munkatárs,  
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Proteomikai Kutatócsoport

**Dr. Révész Ágnes**, tudományos munkatárs,  
HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont, MS Proteomika Kutatócsoport

**Dr. Schlosser Gitta**, egyetemi adjunktus,  
Eötvös Lóránt Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Analitikai Kémiai Tanszék,  
MTA-ELTE Lendület Ionmobilitás Kutatócsoport

**Dr. Szabó Zoltán**, egyetemi adjunktus,  
Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani  
Intézet

**Dr. Tóth Gábor**, tudományos munkatárs,  
HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont, MS Proteomika Kutatócsoport

**Dr. Turiák Lilla**, tudományos főmunkatárs,  
HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont, MTA-TTK Lendület Glikán Biomarker  
Kutatócsoport

# TARTALOM

1.	ELŐSZÓ . . . . .	11
	(Medzihradszky F. Katalin)	
2.	TÖMEGSPEKTROMETRIA: A FEHÉRJEANALÍZISTŐL A PROTEOMIKÁIG . . . . .	13
	(Medzihradszky F. Katalin)	
3.	PROTEOMIKAI MINTA-ELŐKÉSZÍTÉS . . . . .	23
	(Hunyadi-Gulyás Éva, Pettkó-Szandtner Aladár, Darula Zsuzsanna)	
	Mintafeltárás, homogenizálás és fehérjeextrakció . . . . .	24
	Fehérjéből peptideket, avagy „bottom-up” megközelítés. . . . .	26
	Általános megfontolások az emésztéssel kapcsolatban. . . . .	27
	Fehérjeprecipitáció – oldatban emésztés. . . . .	29
	Fehérjék elválasztása gélben, gélben emésztés. . . . .	30
	GASP, FASP, SP3 . . . . .	31
	Minta-előkészítés intakt fehérjeanalízishez, „top-down” megközelítés . . . . .	32
4.	KROMATOGRÁFIA . . . . .	34
	(Janáky Tamás, Szabó Zoltán)	
	A kromatográfia elve . . . . .	36
	Kromatogram . . . . .	37
	Folyadékkromatográfiai állófázisok . . . . .	39
	Folyadékkromatográfiai mozgófázisok. . . . .	40
	A folyadékkromatográfiai elúció típusai . . . . .	41
	A folyadékkromatográfiai rendszer felépítése . . . . .	42
	Folyadékkromatográfia nano- és kapilláris oszlopokon . . . . .	45
	Peptidek és fehérjék folyadékkromatográfiai vizsgálatának lehetőségei a kölcsönhatás típusa szerint . . . . .	48
	Multidimenzionális elválasztások . . . . .	50
	A kromatográfia szerepe a peptidek azonosításában . . . . .	53
5.	TÖMEGSPEKTROMETRIAI ALAPOK. . . . .	55
	(Drahos László, Turiák Lilla, Révész Ágnes, Tóth Gábor)	
	Bevezetés – a tömegspektrométer felépítése . . . . .	55
	A tömegspektrometria alapjai, módszerei, alapfogalmak, definíciók . . . . .	56
	Ionizációs módszerek . . . . .	59
	Elektroporlasztásos ionizáció (Electrospray, ESI) . . . . .	59
	Mátrixszal segített lézerdeszorpció és ionizáció (MALDI) . . . . .	62

	Analizátorok . . . . .	63
	Tandem tömegspektrometria . . . . .	64
6.	TÖMEGSPEKTROMETRIÁS ADATGYŰJTÉSI TECHNIKÁK . . . . . (Kalló Gergő)	66
	Shotgun tömegspektrometriás technikák . . . . .	66
	Célzott tömegspektrometriás technikák . . . . .	71
	Célzott adatfeldolgozás . . . . .	75
7.	FEHÉRJEAZONOSÍTÁS MS/MS SPEKTRUMOK ALAPIJÁN . . . . . (Klement Éva, Hunyadi-Gulyás Éva, Darula Zsuzsanna)	77
	Peptidek fragmentációja, aktiválási módok . . . . .	77
	Fehérjek/peptidek azonosítása adatbázisban történő lekereséssel . . . . .	81
	De novo szekvenálás . . . . .	83
	Poszttranszlációs módosítások azonosítása . . . . .	84
	Kísérlettervezés, gyakorlati szempontok . . . . .	85
	A megfelelő készülék és fragmentációs technika kiválasztása . . . . .	85
	A megfelelő adatbázis és lekeresési paraméterek kiválasztása . . . . .	86
	Mit fogadunk el? . . . . .	87
	Hibakeresés . . . . .	87
8.	KVANTITATÍV PROTEOMIKA . . . . . (Csősz Éva)	90
	Fehérjek relatív kvantitálása . . . . .	91
	Jelölést alkalmazó relatív kvantitálási módszerek . . . . .	91
	Jelölést nem alkalmazó relatív kvantitálási módszerek . . . . .	95
	Célzott proteomikai módszerek . . . . .	96
	Kvantitálás adatfüggetlen módszerek segítségével . . . . .	99
	Módszertervezési szempontok . . . . .	99
	Kritikus lépések . . . . .	100
	Hibalehetőségek . . . . .	101
	Eredmények kiértékelése . . . . .	101
9.	FOSZFORILÁCIÓ VIZSGÁLATA . . . . . (Tóth Gábor, Révész Ágnes, Drahos László, Turiák Lilla)	103
	A foszforiláció és jelentősége . . . . .	104
	Vizsgálati módszerek, a dúsítás és a frakcionálás . . . . .	105
	Affinitás dúsítások . . . . .	107
	Fém-oxid affinitás kromatográfia (MOAC) . . . . .	108
	Állófázisok . . . . .	108
	Felviteli és elúciós pufferek . . . . .	109
	Hatékonyágot és szelektivitást befolyásoló tényezők . . . . .	110
	Immobilizált fém affinitás kromatográfia (IMAC) . . . . .	111
	Állófázisok . . . . .	111
	Felviteli és elúciós pufferek . . . . .	111
	Hatékonyágot befolyásoló tényezők . . . . .	111

Frakcionálási eljárások . . . . .	112
Frakcionálás ioncserés kromatográfiával . . . . .	112
Frakcionálás hidrofíli interakciós kromatográfiával . . . . .	112
Tömegspektrometriás vizsgálati lehetőségek . . . . .	114
Ionizáció . . . . .	114
Fragmentáció . . . . .	114
Alkalmazott készüléktípusok . . . . .	115
Adatértékelés. . . . .	115
Összefoglaló . . . . .	116
 10. BEVEZETÉS A FEHÉRJEGLIKOZILÁCIÓ SZÖVEVÉNYES VILÁGÁBA . . . . .	118
<i>(Medzihradszky F. Katalin)</i>	
 11. FEHÉRJE N-GLIKOZILÁCIÓ . . . . .	122
<i>(Turiák Lilla, Révész Ágnes, Tóth Gábor, Drahos László)</i>	
Szerkezet, osztályozás . . . . .	122
Biológiai funkciók . . . . .	123
Tömegspektrometriás vizsgálati megközelítések . . . . .	123
Lehasított glikánok vizsgálata . . . . .	123
Glikopeptidek vizsgálata . . . . .	125
Oldószeres kicsapás . . . . .	126
Glikopeptidek tömegspektrometriás mérése. . . . .	126
Lehasított glikánok és glikopeptidek vizsgálatának összehasonlítása . . . . .	127
Intakt glikoproteinek vizsgálata . . . . .	127
Tandem tömegspektrometriás technikák a glikomikában, glikoproteomikában . . . . .	128
Oligoszacharidok szerkezetének meghatározására használt tandem tömegspektrometriás technikák . . . . .	128
Glikopeptidek szerkezetének meghatározására használt tandem tömegspektrometriás technikák . . . . .	128
Glikopeptidek modern szerkezetazonosításának szoftveres lehetőségei . . . . .	132
Mennyiségi meghatározás . . . . .	133
 12. FEHÉRJE O-GLIKOZILÁCIÓ . . . . .	136
<i>(Darula Zsuzsanna)</i>	
Glikopeptidek vizsgálata . . . . .	137
O-glikopeptidek dúsítása . . . . .	137
O-glikopeptidek MS/MS fragmentációja . . . . .	138
N- és O-glikopeptidek megkülönböztetése . . . . .	143
O-glikopeptidek azonosítása adatbázis kereséssel . . . . .	144
Intakt O-glikoproteinek vizsgálata . . . . .	147
O-glikán-analízis. . . . .	147
 13. LÉZERDESZORPCIÓS TÖMEGSPEKTROMETRIA. . . . .	150
<i>(Márk László)</i>	
Bevezetés . . . . .	150
MALDI TOF MS a proteomikai vizsgálatokban . . . . .	152
Képkalkulációs tömegspektrometria . . . . .	153

14.	GÉELEKTROFORÉZISEN ALAPULÓ TECHNIKÁK . . . . .	158
	<i>(Kékesi Adrienna Katalin)</i>	
	Izoelektromos fókuszálás (IEF) . . . . .	159
	SDS-PAGE . . . . .	160
	2-D SDS-PAGE . . . . .	160
	Kétdimenziós differenciál-gélelektroforézis (2-D DIGE) . . . . .	161
	Fehérjék azonosítása . . . . .	164
	Előnyök-hátrányok . . . . .	165
15.	IONMOBILITÁS-TÖMEGSPEKTROMETRIA. . . . .	168
	<i>(Schlosser Gitta)</i>	
	Bevezetés az ionmobilitás-spektrometriába. . . . .	168
	Az ionmobilitás-tömegspektrométerek típusai . . . . .	169
16.	ADATELEMZÉS. . . . .	174
	<i>(Csősz Éva, Emri Miklós)</i>	
	Szignifikáns változás – az omikai vizsgálatok szent Grálja? . . . . .	175
	Fehérje-fehérje interakciós hálózatok. . . . .	177
17.	PROTEOMIKA, RENDSZERBIOLÓGIA, „UNBIASED” KUTATÁS. . . . .	183
	<i>(Juhász Gábor)</i>	
18.	HAZAI PROTEOMIKAI KUTATÓLABORATÓRIUMOK. . . . .	189
19.	GYAKRAN ISMÉTELT KÉRDÉSEK. . . . .	197

# 1. ELŐSZÓ

Medzihradsky  
F. Katalin

## Kedves Olvasó!

A kezdet kezdetén szögezzük le, ez a könyv a rendszerbiológia egyik ágát, a fehérjék vizsgálatára fókuszáló proteomikát mutatja be. Pontosabban annak is azt a részterületét, amelynek kulcs analitikai módszere a tömegspektrometria.

A múlt század vége felé az analitikai módszerek és főleg az informatika ugrásszerű fejlődésének eredményeképpen a biokémiai, molekuláris biológiai kutatásban paradigmaváltás következett be. A hipotézis irányította kutatások mellett/helyett egyre inkább teret nyertek azok a vizsgálatok, amelyek nagyobb biológiai egységek működéséről, perturbációjáról, reakcióiról, regenerálódásáról stb. úgy próbáltak képet formálni, hogy e bonyolult rendszerek minél több alkotóeleméről gyűjtöttek lehetőség szerint kvalitatív és kvantitatív információt, amelyet a matematika eszközeivel értelmeztek. A rendszerbiológia tulajdonképp a genomszekvenálási projektek direkt folyamánya, hiszen elég hamar nyilvánvalóvá vált, hogy a humán genomszekvenálás eredményei ellenére vagy éppen azért, rengeteg új kérdést vetett fel, de mindenképpen azt jelezte, hogy a fehérjék közvetlen vizsgálata elengedhetetlen. Így született meg a *proteomika*. Továbbá egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy nemcsak a fehérjéket, hanem a különböző RNS-variációkat, lipideket, cukrokat és metabolitokat is követni/vizsgálni kell, lehetőleg nagy volumenű, automatizált kísérletekben. Manapság számtalan „omika” létezik már: proteomika, sőt foszfo- vagy glikoproteomika, vagy a mindezeket magában foglaló – magyarul szörnyen hangzó – PTM(poszttranszlációs módosítás)omika, valamint transzkriptomika, lipidomika, glikomika, metabolomika stb.

A *proteomikai vizsgálatok szakaszai*: a minták kiválasztása, mérésre való előkészítése, a tömegspektrometriás analízis, az eredmények kiértékelése és értelmezése mind-mind komplex feladat, és ha bármelyik lépés hibás, nem várható használható eredmény. A *min-ta-előkészítések* során alkalmazott módszerek jelentős része évtizedek óta használatos, csak a jelenleg vizsgált kisebb anyagmennyiségekhez és megnövekedett detektálási érzékenységekhez igyekszünk alkalmazkodni. Manapság a fehérjék azonosítása, azaz a vizsgált elegyek kvalitatív analízise rutin feladatnak számít. De még ezt az egyszerű feladatot is körültekintően kell megtervezni, a vizsgálandó minta komplexitását, a komponensek dinamikus tartományát, az esetleges szennyező fehérjéket mind-mind figyelembe kell venni. Amennyiben a jelen lévő poszttranszlációs módosításokra is kíváncsiak vagyunk vagy mennyiségi adatokra is szükségünk van, már sokkal bonyolultabb tervezésre van szükség. Nem árt egy statisztikus segítségét kérni. Izgalmas és szintén jól megfontolt megközelítést igényel, ha egy adott fehérjekomplex minőségi, mennyiségi összetételét és topológiáját is szeretnénk kideríteni. Különösen akkor, hogy ha az alkotó fehérjéket natív állapotukban, azaz enzimemesztés nélkül is jellemezni akarjuk. Hasonlóan gyakori felvetés bizonyos fehérjék sejten belüli elhelyezkedésének vagy együtttható partnereinek vizsgálata, amit nemritkán speciális biológiai jelöléssel és ehhez alkalmazkodó dúsítással segíthetünk. Azaz praktikus, ha a kutatócsoport tagjai a kémiához, biotechnológiához és elválasztástechnikához is értenek. A proteomikai

kutatás akkor és csak akkor lehet igazán sikeres, ha az érdekelt felek: biológusok, orvosok, analitikusok, sőt informatikusok már a kísérletek megtervezésénél együtt dolgoznak.

Ezt a könyvet ajánljuk mindenkinek, aki alaposabb tudásra kíván szert tenni a proteomikáról, pusztán tudományos kíváncsiságból vagy mert kutatásaiban hasznosítani szeretné a proteomikát, akár úgy, hogy maga végzi a kísérleteket, akár úgy, hogy mások eredményeit kívánja hozzáértéssel megvizsgálni, felhasználni, továbbfejleszteni. Reméljük, hogy tudásunkat és tapasztalatainkat megosztva megkönnyítjük az ismerkedést ezzel az ízig-vérig interdiszciplináris kutatási ággal, és ennek eredményeképpen olvasóink értőbb szemmel tanulmányozzák a proteomikai publikációkat, és tájékozottabb partnerként vesznek részt új, ígéretes projektek létrehozásában.



## 2. TÖMEGSPEKTROMETRIA: A FEHÉRJEANALÍZISTÓL A PROTEOMIKÁIG

Medzihradsky  
F. Katalin

A rendszerbiológiai kutatások egyik legfontosabb eszköze a tömegspektrometria. Ennek az analitikai módszernek az a legnagyobb előnye, hogy váratlan/ismeretlen molekulák jelenléte is detektálható, szerkezetük részben vagy részleteiben is meghatározható: a molekulák intakt tömege és fragmentációs analízise szolgáltatja ezeket az információkat. Lehetőség szerint az élő szervezetekben előforduló rendkívül komplex elegyek valamennyi összetevőjéről kívánnánk kvalitatív és kvantitatív adatokat szerezni nyilvánvalóan hatalmas kihívás. Ellenünk dolgozik a különféle alkotóelemek számos nagyságrendet átívelő koncentrációja, néha a végletekig eltérő fizikai és kémiai tulajdonságai (méret, hidrofíl és hidrofób jelleg, elemösszetétel, savasság/bázikusság stb.), amelyek erőteljesen befolyásolják az ionizációt, a detektálhatóságot és a szerkezetről árulkodó fragmentációs folyamatokat. Miután a tömegspektrometria természeténél fogva nem célzott módszer, így bizony találegkonynak kell lennünk a minta-előkészítésnél, hogy minél mélyebbre áshassunk az élő rendszerekben és minél teljesebb képet fessenek számunkra a különböző vegyületcsaládokról feltárt információk, azaz a különböző omikai adatok.

A tömegspektrometria (MS) eleinte csak olyan anyagok vizsgálatát tette lehetővé, amelyek vákuumban könnyen és bomlás nélkül elpárologtathatók voltak. Az ionizációt egy párhuzamos, kb. 70 eV energiával rendelkező elektronnyaláb végezte. Ez szén-szén kötések hasadását is lehetővé tette, tehát nemcsak ionizálódott a vizsgálandó molekula, hanem az ionok egy része fragmentálódott is – azaz egy kísérletben mérhettük meg a teljes molekula és darabjainak tömegét. Az ún. *szektoros tömegspektrométerek* elektromos (E) és mágneses (B) térrel kinetikus energia és tömeg/töltés arány ( $m/z$ ) alapján fókuszálták/választották szét a képződött ionokat, és a mágneses teret fokozatosan csökkentve (szkennelve) tették lehetővé, hogy ezek az ionok (a felbontástól függően külön-külön vagy átfedéssel) el is jussanak a detektorhoz. Az ilyen ún. *elektronionizációs* (EI) kísérletek a kisebb felbontású, és kevésbé pontos tömegmérést biztosító, de egyszerűbben működtethető, teherbíróbb és olcsóbb *kvadrupólusos* (Q) *tömegspektrométerekkel* is elvégezhetők. Az EI-MS lehetővé tette kisebb, nem túl poláros biomolekulák, többek között zsírsavak analízisét. Sajnos, az élettani folyamatok résztvevőinek zöme vákuumban sem párologtatható el. Tehát kisebb nukleotidokat, peptidokat vagy cukrokat is csak több lépéses származékképzéssel/derivatizálással lehetett kellően illékonyra tenni ilyesfajta vizsgálatokra.

Hagyományosan a peptidok, polipeptidok, fehérjék méretének meghatározására számos fizikai módszert használtak, pl. vékonyréteg-kromatográfiát, gél-szűrést vagy SDS-gélelektroforézist. Az aminosavsorrendet az ún. Edman-degradációval határozták meg évtizedekig. Az eljárás lényege, hogy a fehérje N-terminusát módosítjuk fenil-izotiocianáttal, majd a terminális aminosavat savval lehasítjuk, és a terméket kromatográfiával vagy elektroforézissel azonosítjuk. Ezeket a lépéseket ismételtelen végrehajtjuk az új N-terminuson, így fejthük fel a fehérjét aminosavról aminosavra. A módszert 1949-ben írta le névadója, ezután folyamatosan tökéletesítették, automatizálták. Az 1980-as évekre egy automata fehérjeszekvenátor 5 pikomól ( $5 \times 10^{-12}$  mól) fehérjéből, optimális esetben az első 30 aminosavat meg tudta határozni, 50 perces ciklusidővel. Mivel ciklusonként csak az aktuális N-terminá-

lis aminosavat azonosíthatjuk, így a módszer minden fejlődés ellenére nagyon időigényes. Ráadásul a kémiai reakciók hatásfoka nem 100%-os, így bizonyos ciklusszám felett már nem lehet kibogozni, milyen aminosav volt éppen terminális pozícióban. Továbbá a módszer nem alkalmazható keverékekre, és nem működik blokkolt N-terminálisú fehérjékre – pedig az N-terminus poszttranszlációs módosításai (pl. acetilezés, mirisztoilezés) gyakoriak. Ezt a problémát áthidalandó, a fehérjék enzimés emésztésével számos szabad N-terminusra tehetünk szert. Természetesen az emésztés után a peptideket szét kell választani a sikeres szekvenáláshoz. Aztán, hogy összeálljon a teljes fehérje aminosavsorrendje, a meghatározott szekvenciák megfelelő sorrendbe illesztéséhez átfedő szekvenciákat kell generálni/találni. Ennek kézenfekvő módja lehet egy rövidebb idejű (parciális) emésztés vagy más hasítási preferenciát mutató enzimek használata és az így keletkező peptidek megszekvenálása. Hosszú ideig ez az eljárás volt a sikeres fehérjeszekvenálás kulcsa. Aztán a 80-as évek vége felé egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy peptideket tömegspektrometriával is lehet analizálni, keverékeket és kovalensen módosított szekvenciákat is, ráadásul érzékenyebben, gyorsabban és pontosabban is!

A biopolimerek analízisében az áttörést a kíméletesebb, lágy (soft) ionizációs technikák hozták el. Először két olyan ionizációs módszerről kell megemlékeznünk, amit ma már – tudomásom szerint – sehol nem használnak, de a fehérje-tömegspektrometria hajnalán jelentős szerepük volt: ezek a *gyorsatom-ionizáció* (*fast atom bombardment, FAB*) és *másodlagos-iontömegspektrometria* (*liquid secondary ionization mass spectrometry, LSIMS*).<sup>[1, 2]</sup> Ezekkel a módszerekkel erősen poláros, nem illékony vegyületeket is lehetett ionizálni. A vizsgálandó molekula méretét azonban a tömegspektrométerek tömegtartománya limitálta, általában 2000 Da volt a felső határ, azaz ha egy fehérjét akartunk vizsgálni, fel kellett darabolni. A peptidek többnyire 1 µl glicerin-tioglicerin 1:1 arányú 0,1% trifluorecetsavval megsavanyított elegyében kerültek a mintatartóra, zsiliprendszeren keresztül jutottak be az ionforrásba, ahol ezt az oldatcsöppet gyorsított Xe atomok (FAB) vagy Cs<sup>+</sup>-ionok (LSIMS) bombázták, és a képződött protonálódott molekulák (MH<sup>+</sup>) tömegét szektoros készülékekkel vagy kvadrupóllal is mérhettük. Számottevő kötés-hasadás a peptidekben FAB vagy LSIMS ionizáció hatására nem történik. Ahhoz, hogy az így ionizált molekulának a szerkezetét is meg tudjuk határozni, a MH<sup>+</sup>- iont darabokra törni/fragmentálni kellett. Így jutottunk el a tandem tömegspektrometriához, azaz MS/MS analízishez. Ez úgy oldható meg, hogy a tömegspektrométerben az ionok elválasztásáért felelős ún. analizátorból kettőt (vagy többet) „sorba kapcsolunk”. Az első lépés a minta MS1 analízise, azaz a komponensek tömegének meghatározása. Ezután az első analizátor megfelelő beállításával kiválasztunk egy komponenst, azaz egy adott *m/z* értéket, a további vizsgálatra. A tradicionális készülékekben két analizátor között egy ütközési cella foglal helyet [hármass kvadrupól (QQQ) készülékeknél ez a középső kvadrupól]. A cellában a felgyorsult ionok inert gázzal (többnyire Ar) ütköznek. Az így nyert energia egy része vibrációs folyamatok révén kötés-hasadáshoz vezet – manapság is ez a legáltalánosabban használt aktiválási módszer: *ütközésindukált disszociáció* (*collision-induced dissociation, CID*). A gáz nyomásával és az ionok gyorsításával lehet szabályozni a fragmentációs folyamatot, és az így képződött ionokból összeálló spektrumot a második analizátor szkennelésével lehet rögzíteni. S bár ezen technikák egy része felett eljárt már az idő, a proteomika alapjait ilyen módszerekkel fektettük le.

Itt szögezzük le, hogy a **proteomika** egy adott biológiai/élettani egység fehérjetartalmának rendszerbiológiai vizsgálata változatos célokból és módszerekkel. Vizsgálatunk tárgya lehet maga az emberi szervezet, annak egy szövete, morfológiai képződménye, sejtje, sejtszervecskéje, vagy akár egy dinamikus, vagy permanensebb fehérjekomplex is. Egy adott

fehérje különböző variációit **proteoformáknak** nevezzük. Ezek lehetnek különbözőképpen processzáva vagy kovalensen módosítva, képviselhetnek némiképp különböző szekvenciavariánsokat, ami jelenthet izolált aminosav-szubsztitúciókat, betoldásokat, „frame-shift”-et, splice-variánsokat is. A proteoformák alkotják az adott rendszerre és fehérjére jellemző fehérjepopulációt. A fehérjepopulációk összessége a **proteom**. Amikor ezeket a bonyolult fehérjeelegyeket peptidszinten, enzimés emésztés után tanulmányozzuk, ún. „bottom-up” analízist végzünk. Ha az intakt fehérjepopulációt vizsgáljuk, „top-down” mérésekről beszélünk. Az egyéb tömegspektrometriás alapfogalmakat, különböző, manapság használatos készülékeket, technikákat részletesen ismertetjük majd a további fejezetekben.

Úgy adódott, hogy magam is egyike lehettem az úttörőknek (1988-tól a UCSF MS Facility tagjaként), ezért ezt a fejezetet némi személyes nosztalgia szövi át. A teljesség igénye nélkül, nyilvánvalóan némi elfogultsággal fogom bemutatni milyen elképesztő fejlődésen ment keresztül ez a kutatási terület.

A fehérje-tömegspektrometria kezdeteinek talán legmeghatározóbb személyisége *Klaus Biemann*, az MIT professzora.<sup>[3]</sup> *Biemann és tanítványai* a maguk „primitív” eszközeivel *de novo* szekvenáltak peptideket,<sup>[4, 5]</sup> igazoltak nukleotidszekvenálással meghatározott szekvenciákat, tanulmányoztak kovalens módosításokat.<sup>[6]</sup> *Biemann* nevéhez fűződik a peptidfragmensek jelenleg is használatos nomenklatúrája.<sup>[7]</sup> Tanítványa, *R.S. Johnson* foglalta össze doktori disszertációjában és cikkeiben a peptidfragmentáció máig is érvényes szabályait.<sup>[8-10]</sup> Ugyancsak ez a csoport volt az első, amely informatikai módszereket is bevetett a peptidek CID spektrumának értelmezésére.<sup>[11]</sup> Itt emelném ki, hogy a „hőskorban” – én is akkor és így kezdtem a pályám – a fehérjekutatással foglalkozó csoportok zöme 4-szektoros (EBEB) tandem tömegspektrométert használt. Ezek a készülékek lehetővé tették monoizotópos spektrumok felvételét, mert csak a vizsgálandó molekula monoizotópos ionját juttatták el az aktiválásig; továbbá ún. nagy energiájú CID (hiE CID) spektrumok készültek, ahol az ütközési folyamatok elegendő energiát biztosítottak C-C kötések hasadására is, így pl. az izomer Leu-Ile aminosavakat oldalláncuk hasadása alapján meg lehetett különböztetni. Manapság sokkal szélesebb (2 Da) prekursor „ionköteget” aktiválunk, és kizárólag kis energiával, azaz a C-C kötések túlélnek az ütközéseket.

A 4-szektoros, nagy felbontású, nagy tömegpontosságú – ám nagy méretű, súlyos, komplikált és igen drága – készülékek mellett elérhetőek voltak a sokkal kisebb, olcsóbb, egyszerűbben működtethető, viszont kis felbontású és inkább átlag tömegmérést biztosító hármas kvadrupól készülékek. Ilyen műszert használt kutatási területünk másik úttörője *Donald F. Hunt* (University of Virginia, Charlottesville).<sup>[12]</sup> *Hunt* és „jobb keze”, *Jeff Shabanowitz* ma is aktív, technikai és módszerfejlesztésben mindig is élen jártak.<sup>[13]</sup> Talán legnagyobb „dobásuk” egy alternatív fragmentációs mintázatot eredményező MS/MS módszer, az elektrontranszfer disszociáció (ETD) kifejlesztése volt,<sup>[14, 15]</sup> de rengeteg izgalmas biológiai eredményt is köszönhetünk nekik. A sejtfelületi antigénprezentálás kutatásában, az MHC komplexekhez kötődő peptidek jellemzésében és kóros folyamatokhoz való kapcsolódásában fontos jelenségeket írtak le elsőként.<sup>[16-20]</sup>

1988-ban az első *American Society for Mass Spectrometry* (ASMS) által szervezett konferencián, amelyen részt vehettem, mindenkit személyesen ismertem, aki fehérjeanalízissel foglalkozott. Eleinte egyetlen fehérjét vizsgáltunk, esetleg nagyon egyszerű keverékeket. A HPLC frakciókat kézzel szedtük, a mintákat egyenként mikropipettával vittük fel mérésre. Az adatok kiértékelését a kutató végezte, és nem számítógép/szoftver. A hangsúly a szekvenciameghatározáson/igazoláson volt, bár már kovalens módosítások szerkezetét és helyét is meghatározhattuk. A nyolcvanas évek végén a Nobel-díjas [2002-ben *John Fenn* és

Koichi Tanaka kapta ezt a kitüntetést az elektroporlasztásos (electrospray, ESI) és lézeres ionizáció fehérjeanalízisben betöltött szerepéért] lágy ionizációs technikák<sup>[21-22,23-25]</sup> forradalmi változásokat indítottak el, amelynek eredményeképpen megszületett a *proteomika*. Az ezt létrehívó generáció nagy alakjai közé sorolnám a következőket: *Ruedi Aebersold, Steven Carr, Cathy Costello, Brian Chait, Albert Heck, Neil Kelleher, Matthias Mann, Darryl Pappin, Dame Carol Robinson, John Yates III, Roman Zubarev* (a válogatás szubjektív, a teljesség igénye nélkül, és nem fontossági, hanem ABC sorrendben). Külön megemlítenék egy tervező mérnököt, *Alexander Makarov*ot is, aki szívós munkával, nagy szerénységgel megalkotta a legkorszerűbb tömegspektrométerek „lelkét”: az Orbitrap analízátort.<sup>[26,27]</sup> A szoftverfejlesztők közül *Karl Clauser, Jimmy Eng, John Cottrell* ott voltak a kezdeteknél,<sup>[28,29]</sup> míg *Jürgen Cox* és a *Michael MacCoss* laborjában dolgozó *Brendan MacLean* neve leginkább a kvantitatív analízissel fonódott össze.<sup>[30-32]</sup> A főbb eredményeket/újításokat nagy vonalakban összefoglaltam (2.1. táblázat), de ebből az összesítésből nem látszik eléggé a műszerek folyamatos tökéletesítése, a mérnöki zsenialitás, ami a készülékek átalakítását jellemezte, és ami legjobban talán az informatikai eszközök robbanásszerű fejlődéséhez hasonlítható. Részben azért is, mert a készülékek működtetéséhez, az adatgyűjtéshez, megjelenítéshez, feldolgozáshoz a legkorszerűbb számítógépekre volt és van szükség. A tömegspektrométerekre is igaz: mire a laborba kerülnek, már el is avultak.

A tömegspektrometrián alapuló proteomika segítségével rengeteg izgalmas eredmény született a biológia számos területén. Az immunológiát már említettem előbb, de beszélhetnénk fehérjekomplexek összetevőinek, azok részletes topológiájának felderítéséről; poszt-transzlációs módosítások felfedezéséről, és azok biológiai funkcióinak vizsgálatáról; sejtorganellumok fehérjekészletének feltérképezéséről; a gyógyszerészetben új célmolekulák vagy bizonyos fiziológiai folyamatok kulcsmolekuláinak azonosításáról is. Könyvünk fejezetei utalnak majd ilyen projektekre.

Kutatásaink során ismernünk kell módszereink előnyeit és határait. A tömegspektrometria csodálatos analitikai eszköz, de sajnos, ennek is megvannak a maga korlátai.

Először arra mutatnék rá, hogy ha valamilyen fehérjét nem detektálunk, attól az a komponens még jelen lehet az elegyben: talán a detektálási érzékenység alatti mennyiségben, vagy csak rosszul ionizálódnak a peptidjei, esetleg nehezen fragmentálódnak, vagy a fragmentációs mintázat nem egyértelmű. Az is előfordulhat, hogy a minta-előkészítéssel van baj: a használt enzim túl rövid vagy túl hosszú szekvenciákat produkál, vagy egyáltalán nem emészt a bennünket érdeklő fehérjét. Ha tudjuk, mit keresünk, a célnak megfelelően változtatott protokollal úrrá lehetünk a helyzeten. Többféle minta-előkészítéssel, változatos frakcionálási lépésekkel sokféle komplex elegyről szerezhetünk alaposabb információkat. De ne várjunk csodákat, fehérje-PCR nincs. Az immunreakción alapuló detektálás többnyire sokkal érzékenyebb, mint a tömegspektrometria. Ha pedig jó minőségű ellenanyagunk van, a jelen levő egyéb fehérjék nem jelentenek akadályt, ami, sajnos, nem igaz a tömegspektrometriás analízisre.

Ehhez kapcsolódóan azt is megjegyezném – egy komponensű minta gyakorlatilag nem létezik, azaz számon kell tartanunk minden lehetséges idegen fehérjeforrást, amivel a vizsgálandó minta érintkezik. Ha sejtenyésztéssel dolgozunk, számolni kell a médiumban jelen levő marhaszérum-fehérjékkel. Az emésztéshez használt proteolitikus enzimnek is lehetnek detektálható „kísérői”, akár biotechnológiával állították elő, akár valami szövetből vagy baktériumból izolálták. Kedvenc történetem arról szól, hogy *Schistosoma mansoni* parazita szekréciójában a másodlagos hordozó csiga fehérjéit is kimutattuk a csiga táplálékául szolgáló saláta fehérjéivel egyetemben.

Továbbá azt tanácsolnám, ne felejtsük el egy pillanatig sem, hogy „élő”, biológiailag és kémiaiilag aktív rendszereket vizsgálunk. Ez részben a minta integritásának megőrzését nehezíti meg. Először is a különböző sejtfeltárási módszerek megbonthatják a fehérjekomplexeket. Továbbá előfordul, hogy bizonyos poszttranszlációs módosítások nem élnek túl az izolálás folyamatát, néha csak a pH-változásokkal kell nagyon vigyázni, de az is előfordulhat, hogy az elszabadult enzimek eltávolítják a hozzáférhető módosításokat (ez jellemző a foszfatázokra), vagy kontrollálatlanul darabolják a különböző fehérjéket. Ezen felül a fehérjék terminális csoportjai, illetve számos aminosav oldallánca, sőt jó néhány poszttranszlációs módosítás kémiaiilag is aktív, és reakcióba léphet a minta-előkészítés során alkalmazott oldatok valamelyik összetevőjével. Ez annál inkább problémát jelent, mert egyre kevesebb cég hajlandó elárulni a biológiai kísérletek során rutinszerűen használatos kemikáliák pontos összetételét.

A kovalens módosítások, legyenek bár izgalmas poszttranszlációs módosítások vagy kellemetlen mellékreakciók termékei, némiképp aláássák a fragmentációs spektrumok és peptidszekvenciák egyértelmű egymáshoz rendelését. Ezt a megfeleltetést erre a célra kifejlesztett szoftverek végzik, amelyek valószínűségi számításokon alapuló mérőszámmal jelzik minden egyes találat megbízhatóságát. Miután a mellékreakciók mértékét és a váratlan biológiai történések összességét még megbecsülni sem tudjuk, az azonosítások megbízhatóságát hajlamosak vagyunk túlértékelni. Ez különösen akkor okozhat problémát, amikor olyan módosított peptidket vizsgálunk, ahol a módosító csoport(ok) a fragmentációs mintázatot jelentősen befolyásolják, pl. foszforiláció, glikoziláció. További komplikáció, ha több ilyen módosítás is előfordulhat egy adott szekvencián belül.

Módszerünk talán legfontosabb limitáló faktora, hogy darabokból következtetünk a teljes molekulákra, azaz peptidekből igyekszünk összeállítani a fehérjepopuláció teljességét („bottom-up” analízis). Ezt a súlyos problémát előszeretettel söpörjük a szőnyeg alá. Gondoljunk csak bele, egy adott fehérje számos funkcionális komplex tagja lehet, mondjuk, különböző poszttranszlációs módosításokkal ékesítve. Ezen túl lehetnek „tartalék”, módosíthatatlan kópiái a citoszólban és „felesleges”, lebontásra ítélt, ubikvitinált variációi ugyanott, vagy éppen a proteasómákban, félig már megemésztve. Ezek a különböző fehérjék mind produkálhatnak bizonyos triptikus peptidket, természetesen különböző mennyiségben – csak hogy a detektáláskor már csak egy kihasított szekvenciát azonosítunk, nem igazolható a különböző „eredetfehérjék” létezése és pláne nem azok mennyiségi viszonyai. Ugyanezen okból a foszfoproteom vagy glikoproteom vizsgálatakor többnyire nem megállapítható, hogy a különböző pozíciók milyen mértékben vannak módosítva, milyen a helyzeti izomerek relatív aránya, valamint az sem, hogy mely módosítások fordulnak elő együtt a fehérjén belül, azaz hány különböző tagja van a proteínpopulációnak, és milyen ezeknek az eloszlása. Ennek a kérdésnek a megválaszolása már folyamatban van, a proteomika egyik legizgalmasabb, folyamatosan fejlődő ága az intakt fehérjék tanulmányozása, sőt a „natív” tömegspektrometria („top-down” analízis) fehérjekomplexek statikus és dinamikus, kvalitatív és kvantitatív karakterizálását is megcélozta. Természetesen ezekben a kutatásokban is segíthetnek a „primitívebb” enzimés emésztés után lefolytatott analízisek.

Végül kitérnék eredményeink értelmezésére. Számtalan szoftver, statisztikai módszer elérhető e feladathoz, mint azt később ismertetjük. Az érdekes találatoknak/összefüggéseknek érdemes alaposabban utánajárni. Tapasztalatból mondom, ha beleássuk magunkat a ’régmúlt’ irodalmába, nemritkán kiderül, hogy primitívebb, de független módszerekkel más is jutott már hasonló következtetésre, mint mi, és ez megerősíti, hogy helyes irányban tapogatózunk.

Több mint harminc éve foglalkozom fehérjék tömegspektrometriás analízisével. A legújabb technikák segítségével hatalmas mennyiségű információt nyerhetünk minimális mennyiségű mintákból is. Egyre újabb, komplex számítógépes programok segítik ezen hatalmas adathalmazok feldolgozását, „kibogozását”. Mindez ígéretes lehetőségeket kínál mindenkinek, aki okosan, ügyesen, kreatívan tudja használni ezeket az eszközöket. Szükség van rájuk a biológiai alap kutatásban, az orvosi diagnosztikában, a korszerű mezőgazdaságban, a gyógyszergyártásban is. És még a rutin feladatok megoldása is gyakran hoz elének megoldandó „rejtélyeket”, megfejtendő rejtvényeket, ahol a komputer tehetetlen – már csak ezért is érdekes és érdemes a proteomikával foglalkozni.

### 2.1. táblázat – A tömegspektrometriás fehérjeanalízis fejlődésének főbb eseményei\*

Év	Új technika / módszer / eredmény	Ref
1981	ionizáció a minta atomokkal vagy ionokkal történő bombázásával (fast atom bombardment → FAB, liquid secondary ionization MS → <b>LSIMS</b> )	1
1986		2
1985	elektroporlasztásos ionizáció (electrospray ionization → <b>ESI</b> )	21
1989		22
1986	fehérjeszekvenálás tandem tömegspektrometriával (MS/MS), peptidek fragmentációja ütközéses aktiválással (collision-induced dissociation → <b>CID</b> )	12
1987		4, 5
1987	peptidek fragmentációjának szabályszerűségei	8
1988		9, 10
1987	kovalens módosítások jellemzése	6
1988	lézerdeszorpció	23, 24
1989	többszörösen töltött ionok CID analízise	13
1989	peptidek fragmentációs spektrumának szoftveres kiértékelése	11
1990	HPLC frakcionálás és tandem tömegspektrometria on-line összekapcsolása ( <b>LC-MS/MS</b> )	33
1990	mátrix segített lézerdeszorpció/ionizáció (matrix-assisted laser desorption/ionization → <b>MALDI</b> )	25
1990	peptidfragmentáció egyezményes nevezéktana	7
1990	prekurzor ion interferencia	34
1992	teljes <i>de novo</i> szekvenciameghatározás és igazolása intakt fehérje mérésével	35
1992	fehérjék gélben ( <b>SDS-PAGE</b> ) emésztése	36
1993	peptidek analízise ioncsapda (ion trap) tömegspektrométerrel	37
1993	fehérjeazonosítás a frakcionálatlan emésztési elegyben detektált tömegek alapján (peptide mass fingerprint → <b>PMF</b> )	38
1996	nagy érzékenységű nanospray ionforrás ( <b>nanoESI</b> )	39, 40
1996	CID adatok automatizált peptidhez rendelése fehérje-adatbázisban történő lekereséssel	28
1997	sejtek, szövetek feltérképezése MALDI tömegspektrometriával ( <b>MALDI imaging</b> )	41
1998	hidrogén/deutérium-csere fehérjék, fehérjekomplexek 3D szerkezetének vizsgálatában	42, 43
1998	natív fehérjekomplexek tömegspektrometriás analízise	44



Év	Új technika / módszer / eredmény	Ref
1998	peptidek elektronbefogással kiváltott disszociációja (electron-capture dissociation → <b>ECD</b> )	45
1999		46, 47
1999	mennyiségi meghatározás Cys-oldalláncok szelektív jelölésével (isotope-coded affinity tag → <b>ICAT</b> )	48
1999	intakt fehérje MS/MS ( <b>top down</b> )	49
2001	automatizált adat-függő LC-MS/MS adatgyűjtés (data-dependent acquisition → <b>DDA</b> )	50
2001	on-line kétdimenziós (2D) frakcionálással végrehajtott LC/LC-MS/MS analízis (multidimensional protein ID technology → <b>MUDPit</b> )	51
2002	mennyiségi meghatározás stabil izotóppal jelölt aminosavak beépülésével (stable isotope labeling in cell culture → <b>SILAC</b> )	52
2003	Orbitrap analízátor	26
2005		27
2004	mennyiségi meghatározás peptidek izobár jelölésével (isobaric tags for relative and absolute quantitation → <b>ITRAQ</b> )	53
2004	peptidek elektrontranszferrel kiváltott disszociációja (electron-transfer dissociation) → <b>ETD</b>	14
2004	adat-független LC-MS/MS adatgyűjtés peptidazonosításra és mennyiségi meghatározásra (data-independent acquisition → <b>DIA</b> )	54
2004	peptidek mennyiségi meghatározása diagnosztikus fragmensek alapján (selected/multiple reaction monitoring → <b>SRM/MRM</b> )	55
2005	fehérjeemésztés szűrővel ellátott mikrocentrifuga csövekben (filter-aided sample preparation → <b>FASP</b> )	56
2009		57
2005	alternatív 2D frakcionálás: on-line HPLC + ionmobilitás-MS (nanoLC/MS-FAIMS)	58
2011	egyetlen sejt analízise (single cell proteomics) → <b>scProteomics</b>	59
2011	komplexek összetétele és topológiája keresztkötések segítségével	60
2012	adatfüggetlen adatgyűjtés, peptidazonosítás spektrumkönyvtárakból ( <b>spectral library</b> )	61
2012	peptidek hibrid fragmentációja ( <b>ETHcD</b> )	62
2012	peptidek mennyiségi meghatározása teljes fragmentációs spektrum alapján (parallel reaction monitoring → <b>PRM</b> )	63
2014	kvantitatív egysejt proteomika	64
2014	minta-előkészítési protokoll egyetlen (pete)sejtre	65
2019	retenció idő és fragmentáció predikció → <b>Prosit</b>	66
2022	on-line peptidazonosítással segített adatgyűjtés ( <b>real-time search-assisted acquisition</b> )	67
2022	proteoformák referencia atlasza ( <b>Proteoform Atlas</b> )	68

\* Ez az összeállítás némiképp szubjektív és önkényes. Nem mindig világos, ki volt az első. Az ötletek megszületését, az első kísérleteket jelentős késéssel követheti a siker. Továbbá néha sikerül olyat is újként leközölni, ami más találmánya volt, mégis a későbbi cikkekre hivatkozik mindenki.

## Ajánlott irodalom

1. Morris HR, Panico M, Barber M, et al. Fast atom bombardment: a new mass spectrometric method for peptide sequence analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981; 101:623-31.
2. Falick AM, Wang GH, Walls FC. Ion source for liquid matrix secondary ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 1986; 58:1308-11.
3. Biemann K. Laying the groundwork for proteomics: mass spectrometry from 1958 to 1988. *J Proteomics.* 2014; 107:62-70.
4. Scoble HA, Martin SA, Biemann K. Peptide sequencing by magnetic deflection tandem mass spectrometry. *Biochem J* 1987; 245:621-2.
5. Johnson RS, Biemann K. The primary structure of thioredoxin from *Chromatium vinosum* determined by high-performance tandem mass spectrometry. *Biochemistry* 1987; 26:1209-14.
6. Biemann K, Scoble HA. Characterization by tandem mass spectrometry of structural modifications in proteins. *Science* 1987; 237:992-8.
7. Biemann K. Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods Enzymol.* 1990; 193:886-7.
8. Johnson RS, Martin SA, Biemann K, et al. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal Chem.* 1987; 59:2621-5.
9. Johnson RS, Martin SA, Biemann K. Collision-induced fragmentation of (MH) ions of peptides. Side chain specific sequence ions. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* 1988; 86:137-54.
10. Johnson RS. Ph.D. Thesis, 1988; MIT, Cambridge, MA.
11. Johnson RS, Biemann K. Computer program (SEQPEP) to aid in the interpretation of high-energy collision tandem mass spectra of peptides. *Biomed Environ Mass Spectrom* 1989; 18:945-57.
12. Hunt DF, Yates JR III, Shabanowitz J, et al. Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:6233-7.
13. Hunt DF, Zhu NZ, Shabanowitz J. Oligopeptide sequence analysis by collision- activated dissociation of multiply-charged ions. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1989; 3:122-4.
14. Syka JE, Coon JJ, Schroeder MJ, et al. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:9528-33.
15. Duselis EM, Panepinto MC, Syka JEP, et al. Improved sequence analysis of intact proteins by parallel ion parking during electron transfer dissociation. *Anal Chem.* 2021; 93:15728-35.
16. Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, et al. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science.* 1992; 255:1261-3.
17. Henderson RA, Michel H, Sakaguchi K, et al. HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. *Science.* 1992; 255:1264-6.
18. Engelhard VH, Obeng RC, Cummings KL, et al. MHC-restricted phosphopeptide antigens: preclinical validation and first-in-humans clinical trial in participants with high-risk melanoma. *J Immunother Cancer.* 2020; 8:e000262.
19. Malaker SA, Penny SA, Steadman LG, et al. Identification of glycopeptides as posttranslationally modified neoantigens in leukemia. *Cancer Immunol Res.* 2017; 5:376-84.
20. Cobbold M, De La Peña H, Norris A, Polefrone JM, et al. MHC class I-associated phosphopeptides are the targets of memory-like immunity in leukemia. *Sci Transl Med.* 2013; 5:203ra125.
21. Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, et al. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem.* 1985; 57:675-9.
22. Fenn JB, Mann M, Meng CK, et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 1989; 246:64-71.
23. Tanaka K, Waki H, Ido Y, et al. Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1988; 2:151-3.
24. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 1988; 60:2299-301.
25. Hillenkamp F, Karas M. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol.* 1990; 193:280-95.
26. Hardman M, Makarov AA. Interfacing the Orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source. *Anal Chem.* 2003; 75:1699-705.
27. Hu Q, Noll RJ, Li H, et al. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom.* 2005; 40:430-43.



28. Yates JR, Eng JK, Clauser et al.; Search of sequence databases with uninterpreted high-energy collision-induced dissociation spectra of peptides. *J Am Soc Mass Spectrom.* 1996; 7:1089-98.
29. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, et al.; Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 1999 20:3551-67.
30. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol.* 2008; 26:1367-72.
31. Mortensen P, Gouw JW, Olsen JV, et al. MSQuant, an open source platform for mass spectrometry-based quantitative proteomics. *J Proteome Res.* 2010; 9:393-403
32. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics.* 2010; 26:966-8.
33. Huang EC, Henion JD. LC/MS and LC/MS/MS determination of protein tryptic digests. *J Am Soc Mass Spectrom.* 1990; 1:158-65.
34. Falick AM, Medzihradszky KF, Walls FC. Artifacts in four-sector tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1990; 4:318-22.
35. Medzihradszky KF, Gibson BW, Kaur S, et al. The primary structure of fatty- acid-binding protein from nurse shark liver. Structural and evolutionary relationship to the mammalian fatty-acid-binding protein family. *Eur J Biochem.* 1992; 203:327-39.
36. Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC , et al. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis *Anal Biochem* 1992; 203:173-9.
37. Jonscher K, Currie G, McCormack AL, et al. Matrix-assisted laser desorption of peptides and proteins on a quadrupole ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1993; 7:20-6.
38. DJ Pappin, P Hojrup, A J Bleasby. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. 1993; *Curr Biol.* 3:327-32.
39. Wilm M, Mann M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem.* 1996; 68:1-8.
40. Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, et al. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature.* 1996; 379:466-9.
41. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem.* 1997; 69: 4751-60.
42. Mandell JG, Falick AM, Komives EA. Measurement of amide hydrogen exchange by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem.* 1998; 70:3987-95.
43. Mandell JG, Falick AM, Komives EA. Identification of protein-protein interfaces by decreased amide proton solvent accessibility. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:14705-10.
44. Benjamin DR, Robinson CV, Hendrick JP, et al. Mass spectrometry of ribosomes and ribosomal subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:7391-5.
45. Zubarev RA, Kelleher NL, McLafferty FW. Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process. *J. Am. Chem. Soc.* 1998; 120: 3265-6.
46. Zubarev RA, Kruger NA, Fridriksson EK, et al. Electron capture dissociation of gaseous multiply-charged proteins is favored at disulfide bonds and other sites of high hydrogen atom affinity. *J. Am. Chem. Soc.* 1999; 121:2857-62.
47. Kelleher NL, Zubarev RA, Bush K, et al. Localization of labile posttranslational modifications by electron capture dissociation: the case of gamma-carboxyglutamic acid. *Anal Chem.* 1999; 71:4250-3.
48. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol.* 1999; 17:994-9.
49. Kelleher NL, Lin HY, Valaskovic GA et al. Top down versus bottom up protein characterization by tandem high-resolution mass spectrometry. *J. Am. Chem Soc.* 1999; 121:806-12.
50. Tolley L, Jorgenson JW, Moseley MA. Very high pressure gradient LC/MS/MS. *Anal Chem.* 2001; 73:2985-91.
51. Wolters DA, Washburn MP, Yates JR 3rd. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem.* 2001; 73:5683-90.
52. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2002; 1:376-86.
53. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics.* 2004; 3:1154-69.
54. Venable JD, Dong MQ, Wohlschlegel J, et al. Automated approach for quantitative analysis of complex peptide mixtures from tandem mass spectra. *Nat Methods.* 2004; 1:39-45.

55. Kuhn E, Wu J, Karl J, Liao H, Zolg W, Guild B. Proteomics. Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and <sup>13</sup>C-labeled peptide standards. 2004; 4:1175-86.
56. Manza LL, Stamer SL, Ham AJ, et al. Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters. *Proteomics*. 2005; 5:1742-45.
57. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 2009; 6:359-62.
58. Venne K, Bonneil E, Eng K, et al. Improvement in peptide detection for proteomics analyses using NanoLC-MS and high-field asymmetry waveform ion mobility mass spectrometry. *Anal Chem*. 2005; 77:2176-86.
59. Koroleva OA, Cramer R. Single-cell proteomic analysis of glucosinolate-rich S-cells in *Arabidopsis thaliana*. *Methods*. 2011; 54:413-23.
60. Rappsilber J. The beginning of a beautiful friendship: cross-linking/mass spectrometry and modelling of proteins and multi-protein complexes. *J Struct Biol*. 2011; 173:530-40.
61. Gillet LC, Navarro P, Tate S, et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11:O111.016717
62. Frese CK, Altelaar AF, van den Toorn H, et al. Toward full peptide sequence coverage by dual fragmentation combining electron-transfer and higher-energy collision dissociation tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2012; 84:9668-9673.
63. Peterson AC, Russell JD, Bailey DJ, et al. Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11:1475-8.
64. Smits AH, Lindeboom RG, Perino M, et al. Global absolute quantification reveals tight regulation of protein expression in single *Xenopus* eggs. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42:9880-9891
65. Hughes CS, Foehr S, Garfield DA, et al. Ultrasensitive proteome analysis using paramagnetic bead technology. *Mol. Syst. Biol*. 2014; 10:757. (SP3)
66. Gessulat S, Schmidt T, Zolg DP, et al. Prosit: proteome-wide prediction of peptide tandem mass spectra by deep learning. *Nat Methods*. 2019; 16:509-18.
67. Furtwängler B, Üresin N, Motamedchaboki K, et al. Real-time search-assisted acquisition on a tribrid mass spectrometer improves coverage in multiplexed single-cell proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2022; 21:100219.
68. Melani RD, Gerbasi VR, Anderson LC, et al. The Blood Proteoform Atlas: A reference map of proteoforms in human hematopoietic cells. *Science*. 2022 ; 375:411-8.

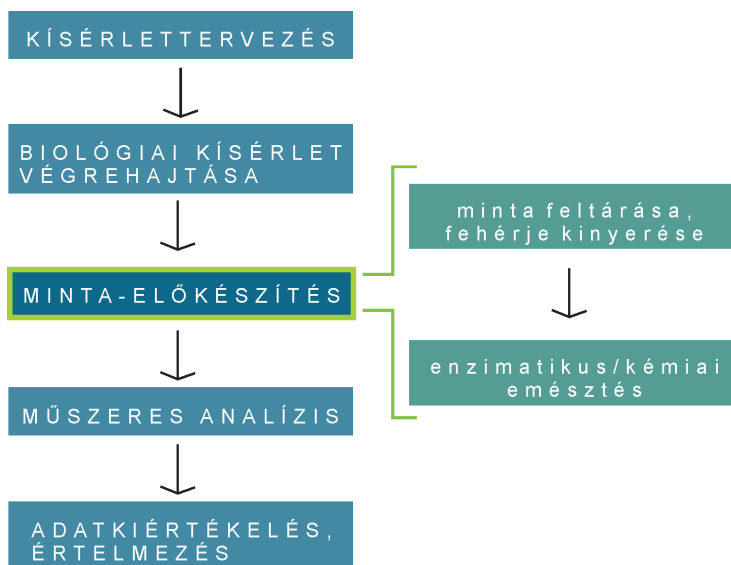
### 3. PROTEOMIKAI MINTA-ELŐKÉSZÍTÉS

Hunyadi-Gulyás Éva,  
Pettkó-Szandtner Aladár,  
Darula Zsuzsanna

A tömegspektrometria alapú proteomikai kísérlet sikerességét több tényező befolyásolja, ezek közül az egyik a megfelelő minta-előkészítés.

Mindjárt az elején meg kell határozni, hogy mennyiségi vagy minőségi elemzés-e a célunk és annak megfelelő stratégiát kell kidolgozni. Tehát az első lépés a célkitűzés világos, pontos megfogalmazása, a minta előállításának megtervezése, kivitelezése. Következő a minta feldolgozása a tömegspektrometriás méréshez és az analízis, majd jön a kiértékelés és az eredmények értelmezése (3.1. ábra).

Az egyes folyamatok nem függetlenek, mind az előtte mind az utána következő lépéssel szinkronban kell lenniük. Elengedhetetlen az egymásra épülő lépések tökéletes összhangja.



3.1. ábra. A proteomikai munkafolyamat lépései

Az 3.1. ábrán feltüntetett folyamatokat még további részfolyamatokra bonthatjuk, illetve kiegészülnek tisztítási, elválasztási, fehérjemennyiség-meghatározási lépésekkel.

A minta-előkészítés legyen standardizált, megbízható, reprodukálható, kényelmes, lehetőleg minél kevesebb lépést tartalmazzon, és rendkívül fontos: legyen MS kompatibilis!

Különböző biológiai minták, amelyek lehetnek például sejt-, szövetkultúra, szerv, teljes egyed (pl. rovar lárvá, báb) vagy valamilyen testfolyadék (pl. vér, vizelet, nyál, könny, gerincvelői folyadék), fehérjetartalmát a tömegspektrometriás analízissel kompatibilis formára kell hozni. A minta-előkészítés során ezt mindvégig szem előtt kell tartani, azaz a legtöbb esetben a különböző biológiai mintákból fehérjét, majd végül peptidelegyet kell készítenünk.

Alapszabály, hogy minél kevesebb lépésből áll a minta-előkészítés, annál kisebb a veszteség, annál jobban tükrözi a kapott eredmény a valóságot. Gondoljunk csak arra, hogy minden lépés okozhat mintavesztést, minden alkalommal, amikor új „edénybe” kerül a minta, lesz veszteség, mert valamennyi ott marad az előzőben. Ha reagensekkel kezeljük a mintát, keletkezhetnek melléktermékek, az egyes kémiai/enzimes reakciók nem 100%-os hatásokkal játszódnak le, valamint a fehérje-koncentráció mérése is veszteséggel jár.

A minta-előkészítést két szakaszra bonthatjuk:

1. a vizsgálandó biológiai mintát feltárjuk, kivonjuk belőle fehérjetartalmát
2. a fehérjeelegyből tömegspektrometriai analízisre alkalmas mintát készítünk, leggyakrabban enzimes emésztéssel (3.1. ábra).

Szűkebb értelemben a második folyamatot értjük proteomikai minta-előkészítésen, de belátható, hogy az első rész is legalább olyan lényeges, nem beszélve a mintagyűjtésről. Nem létezik univerzális módszer, a legcélravezetőbbet az analízis pontos célja, a minta és a tudományos kérdés ismeretében kell megalkotni, ezért először érdemes válaszolni az alábbi kérdésekre:

### Mi a vizsgálat célja?

- Felfedező kutatás, minden fehérjére kíváncsiak vagyunk, ami abban a mintában van?
- Csak egy vagy néhány fehérjét szeretnénk monitorozni?
- Esetleg csak egy adott fehérje módosításait szeretnénk látni?
- A minőségi elemzés mellett kíváncsiak vagyunk a mennyiségi viszonyokra is?
- Mennyire komplex a minta?
- Valamilyen poszttranszlációs mintázatot szeretnénk vizsgálni?
- Egy molekula (fehérje, kismolekula) kölcsönható partnereit keressük?

A proteomikai vizsgálat folyamatában a minta-előkészítés kulcslépés, mert amit itt elveszítünk, az örökre elveszett. A szakirodalomban számos könyv, könyvfejezet, összefoglaló cikk foglalkozik ezzel a témával,<sup>[1-5]</sup> ez is mutatja, hogy egyetlen fejezetben lehetetlen minden ismeretet átadni, de célunk egy jó összefoglaló készítése, melyet hivatkozásokkal tesszünk teljesebbé.

Minden vizsgálat esetén érvényes, hogy a minta komplexitását csökkenteni kell, ugyanis még a legújabb tömegspektrométerek sem birkóznak meg az összetett biológiai rendszerrel és az azokra jellemző dinamikus tartománnyal.

### Mintafeltárás, homogenizálás és fehérjeextrakció

A biológiai mintákból ki kell vonni a fehérjéket, ezért először fel kell tární a mintát, az esetleg membránba zárt beltartalmat ki kell szabadítani. Szilárd minták esetén általában mechanikai homogenizálást alkalmazunk, majd megfelelő lizáló puffer segítségével kioldjuk a fehérjéket. Gondoskodni kell arról, hogy az endogén proteázok és más enzimek ne változtassák meg a fehérjéket, ezért alacsony hőmérsékleten és/vagy megfelelő inhibitorok hozzáadása mellett kell dolgozni. Ha pl. foszforiláció vizsgálatát tervezzük, blokkolni kell a foszfátázok működését is, a proteázokat pedig azért kell gátolni, mert nonspecifikus hasításokat hagynak maguk mögött, ami megnehezíti az adatok értelmezését.

A biológiai mintákat legjobb a mintagyűjtés után azonnal cseppfolyós nitrogénben lefagyasztani (*snap freeze*) és felhasználásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolni, ezzel megakadályozzuk a degradációt. Ilyen hőmérsékleten az enzimek nem működnek, gyakorlatilag több szempontból is

„befagyasztjuk” a mintákat. A feldolgozás szintén hűtött állapotban történik az alábbi módszerek valamelyikével (a teljesség igénye nélkül), lízispuffer hozzáadásával, vagy anélkül:

- Cseppfolyós nitrogénnel hűtve dörzsmozsárban elporítjuk a mintát, majd előre lemerített csövekbe porciózzuk az így keletkezett por állagú mintát, hogy a továbbiakban ismert mennyiségekkel tudjunk tovább dolgozni (természetesen továbbra is  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on kell tárolni felhasználásig). Így járhatunk el pl. növényi mintákkal (gyökér, levél, mag stb.), lágy szövetekkel, mint pl. máj, agy. A porítást homok hozzáadásával segíthetjük, de akkor természetesen a minta tömegének pontos meghatározása problematikusabb.
- Szövetlízálóban hűtve, vagy szobahőmérsékleten, rozsdamentes acél- vagy üveggolyó (kvarc) segítségével 15–50 Hz-en rázatva néhány percig (akár keményebb szövetekhez is alkalmas ez a feltárási mód).
- Nagy sebességű késes homogenizáló (pl. Ultra-Turrax).
- Kézi vagy motoros homogenizáló (sejtroncsoló) lágy mintákhoz (Potter–Elvehjem vagy Dounce homogenizátor).
- French-press – nyíróerőn alapuló mechanikai sejtfeltárási lízispufferben.
- Fagyasztás–felengedés lízispufferben (itt a keletkező jégkristályok teszik tönkre a membránokat).
- Ultrahangos feltárási.
- Enzimek vagy vegyszerek segítségével.

A hatékony és teljes mintafeltárási (sejtmembrán, sejttal mechanikai felbontása) elengedhetetlen a további sikeres fehérje vizsgálatokhoz, mert nélküle nagy veszteségekkel számolhatunk és/vagy a proteáz- és más enziminhibitorok sem tudnak hatékonyan működni.

A feltárási/homogenizálási lépést követi vagy bizonyos esetekben azzal párhuzamos a fehérje kioldása lízispufferrel, amely tartalmazza a megfelelő enziminhibitorokat is. A lízispufferes fehérjeextrakciót segíthetjük szonikálással, sejtroncsolóval stb. (lásd fent).

Ma már a vegyszergyártók számos a tömegspektrometriával (MS) kompatibilis lízispuffert ajánlanak különböző eredetű mintákhoz. Ezek az oldatok a pH-stabilizáló puffer, megfelelő sókoncentráció és esetleg kevés detergens mellett proteáz- és foszfatázgátlókat, inhibitorokat, enzimszubsztrátokat tartalmaznak. Dolgozhatunk denaturáló vagy nem denaturáló pufferrel aszerint, hogy mi az analízisünk célja. Ha fehérjekomplexeit szeretnénk azonosítani és a lízis után immunoprecipitálunk, ko-immunoprecipitálunk, akkor nem használhatunk denaturáló szert és erős detergenst, vagy kaotropot tartalmazó puffert sem, hiszen ezek mellett, hogy segítenek oldatban tartani a fehérjéket, éppen a feltérképezni kívánt fehérje-fehérje kölcsönhatásokat bontják meg. Ha viszont célunk a minta teljes fehérjetartalmának azonosítása, bátrabban használhatjuk ezeket a vegyszereket, de figyeljünk oda, hogy az alkalmazott detergens MS-kompatibilis legyen, különben a tömegspektrometriás analízisnél okoz majd problémát. A detergens és a puffer egyéb összetevői befolyásolhatják a minta-előkészítés további lépéseit, mint a fehérjekoncentráció meghatározását, az esetleges immunoprecipitációt, az enzim fehérjeemésztést, a kvantitatív mérésekhez szükséges jelölést vagy a tömegspektrometriás analízist. Egyesektől újabb lépések beiktatásával – mint pl. fehérjeprecipitáció, SDS-gélelektroforézis, detergenseltávolító oszlop használata, hígítás, oldószercsere stb. – meg lehet szabadulni, de pl. a Triton-X és Tween-20, az SDS-gélelektroforézis kivételével, ezekkel a módszerekkel sem távolítható el teljes mértékben.

A fehérjeemésztést további tisztítási, dúsítási, szeparáló lépések előzhetik meg. Például fehérjekomplext tisztíthatunk affinitás alapon, immunoprecipitációval, ko-immunoprecipitációval, vagy kölcsönható fehérjéket dúsíthatunk egy szilárd hordozóhoz (pl. agaróz-

gyöngy, mágneses részecske, oszlop) kötött kismolekulával vagy másik fehérjével. Számos biológiai minta, mint pl. a szérum-, gerincvelői folyadék, nyál-, verejték-, könnyminták fehérjetartalmának ~90%-át néhány nagy mennyiségben jelen lévő, ún. abundáns fehérje teszi ki. Ezeket a fehérjéket ún. depletáló oszlopokon immunoprecipitációval kivonhatjuk, így a kisebb mennyiségben jelen levő fehérjék detektálhatósága megnő. Affinitás alapú tisztításhoz a mintát célszerű natív állapotban tartani annak érdekében, hogy a kölcsönhatások kialakulhassanak. A nem kötődő komponenseket pufferes mosással távolítjuk el, végezetül eluáljuk a fehérjéket. Az elúciót enzimés emésztéssel is helyettesíthetjük, amikor az emésztést közvetlenül a hordozóhoz kötött fehérjéken hajtjuk végre.<sup>[6]</sup>

### Fehérjéből peptideket, avagy „bottom-up” megközelítés

Az elektroporlasztásos ionforrással (ESI) rendelkező tömegspektrométerek többsége esetében a mérési tartomány teteje a 2000  $m/z$  és 6000  $m/z$  tartományban mozog. Ez viszont azt jelenti, hogy a fehérjék helyett célravezetőbb a fehérjék feldarabolása után nyert peptidek analízise, annál is inkább, mert szekvencia információra is szükségünk van. Ebben a tömegtartományban a tömegspektrométerek felbontása és érzékenysége is nagyobb, valamint a peptidek MS/MS spektrumai is több információt tartalmaznak, mintha intakt fehérjéből indulnánk ki. Tehát a fehérjékből peptideket kell generálni! Ugyanakkor egy fehérjéből akár több száz peptid is keletkezhet, azaz jóval komplexebb lesz a mintánk, ezért a peptideket nem direkt injektálással, hanem kromatográfiás szeparálás után mérjük (lásd 4. fejezet).

A fehérjelízis-pufferek összetétele általában nem kompatibilis a következő enzimés lépéssel, ezért valamilyen módon meg kell tőlük szabadulni, vagy legalább le kell csökkenteni a zavaró komponensek koncentrációját a megfelelő szintre (lásd 3.1 táblázat).

**3.1. táblázat.** Tripszines emésztés során tolerált maximális reagenskoncentrációk

Kaotrop ágensek	Karbamid / tiourea	2 M
	Guanidin-hidroklorid	0,75 M
Detergenssek	SDS	0,05%
	CHAPS	0,5%
	NP-40 (Igepal)	1%
Sók, pufferek		< 250 mM összesen pH ~ 8–9
Redukálószer	DTT	20 mM
	TCEP	5 mM

Erre a célra különböző módszereket alkalmazhatunk, mint fehérjeprecipitáció, puffercsera, hígítás, vagy ha még egy fehérjeszintű frakcionálást szeretnénk beiktatni, akkor elválaszthatjuk a fehérjéket gélben, egy- vagy kétdimenziós gélelektroforézist alkalmazva. Szeparálás nélkül is kihasználhatjuk a gélben-emésztés kényelmét a GASP, gél által segített minta-előkészítés (*Gel-aided sample preparation*<sup>[7]</sup>) módszerrel, illetve a mintapufferben levő oldatmintát gél nélkül is feldolgozhatjuk (FASP – *filter-aided sample preparation*<sup>[8]</sup>). Különösen kis mennyiségű minta emésztésére dolgozták ki az SP3 (*single-pot solid-phase-enhanced sample preparation*<sup>[9]</sup>) módszert, ahol mágneses gyöngy felületén zajlik az emésztés. Ezek a

módszerek nagyobb beruházás nélkül elvégezhetők normál proteomikai laboratóriumokban.

### Általános megfontolások az emésztéssel kapcsolatban

Peptidek előállítására leggyakrabban enzimés emésztést alkalmazunk. Többféle endoproteáz, azaz a szekvencia „belsejében” hasító enzim használatos, de kémiai ágensekkel is dolgozhatunk. A lényeg, hogy lehetőleg előre megjósolható, megfelelő mérettartományba eső peptideket kapjunk. Ismeretlen fehérje, fehérjeelegy vizsgálata esetén a legjobb választás a tripszin!

Ismert szekvenciájú fehérje esetén, ha annak valamilyen módosítására vagyunk kíváncsiak, vagy a teljes szekvenciát szeretnénk bizonyítani (pl. monoklonális antitestek vizsgálata esetén van ilyen igény), akkor a megfelelő enzim vagy enzimbombináció kiválasztásához érdemes szoftvereket használni, melyek listázzák a várható peptideket. Ilyen például az

- Expasy (<https://www.expasy.org/>) oldalról elérhető *PeptideCutter* ([https://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](https://web.expasy.org/peptide_cutter/)) vagy a
- *ProteinProspector* (<https://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>), *MS-Digest* (<https://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>) modulla.

A legelterjedtebben használt endoproteáz a tripszin. Népszerűségét elsősorban a specifitásának köszönheti: a tripszin a fehérjéket két bázikus aminosav, az arginin és a lizin karboxil terminálisán hasítja, így átlagosan 7–20 aminosavból álló, legalább két protonálható csoporttal (N-terminális aminocsoport és C-terminális lizin vagy arginin) rendelkező peptidekhez jutunk, amelyek a tömegspektrometriás analízis tökéletes alanyai, mind méret, mind ionizálhatóság szempontjából. Mivel az enzimek is fehérjék – így magukat is emésztetik. Viszont az emésztmény tisztaságának védelmében előnyös, ha nem szennyezzük emésztőenzim eredetű peptidekkel. A kereskedelmi forgalomban kapható, tömegspektrometriás proteomikai vizsgálatokhoz ajánlott tripszin (*MS grade*) lizin oldalláncait módosítja, ezzel csökkentve az autolízis mértékét. A természetes eredetű (jellemzően sertés vagy marha hasnyálmirigyből izolált) tripszinkivonatok specifitásának növelése érdekében a kimo- triptikus aktivitás csökkentését inhibitor hozzáadásával érik el.

**Proteázok:** A fehérjék peptidkötéseit bontó enzimeket proteázoknak nevezzük. Megkülönböztünk exo- és endoproteázokat aszerint, hogy a fehérje végein vagy a fehérje belsejében hasítanak.

Más enzimek és kémiai reagensek is használatosak (3.2. táblázat), amelyek talán a tömegspektrometriás analízis szempontjából nem annyira ideálisak, de a fehérjék hatékony feldarabolásához nagyon hasznosak lehetnek, ha a tripszin nem képes ezt a feladatot ellátni, azaz Arg és Lys hiányában, vagy épp ellenkezőleg, amikor nagyon sűrűn vannak a fehérjékben triptikus hasítóhelyek.

A megfelelő pH-tartományon kívül bizonyos ionok, detergensok vagy egyéb vegyületek jelenléte lehet nélkülözhetetlen, vagy elfogadhatatlan egyes enzimek optimális működéséhez. Ennek is utána kell nézni már a minta-előkészítés tervezésekor!

A fehérjék harmadlagos szerkezetét diszulfidhidak is stabilizálhatják. Ez az extracelluláris és membránfehérjékre jellemző poszttranszlációs módosítás két cisztein aminosav-oldallánca között, oxidáció révén alakul ki. Ha nem cél a diszulfidhidak helyzetének meghatározása, akkor csak megnehezítik a fehérjeazonosítást. Az S–S kötések fixálják a fehérjék harmadlagos szerkezetét, akadályozzák az emésztőenzimek hatékony működését,

**3.2. táblázat.** Enzimek, kémiai reagensek fehérjék feldarabolásához

Enzim/kémiai ágens	Specifititás	Kivétel	Optimális pH-tartomány
Tripszin	Arg↓, Lys↓	*Pro előtt	7,5–9,0
Kimotripszin	Tyr↓, Phe↓, Trp↓, Leu↓	Pro előtt	1,5–8,5
Lys-C	Lys ↓	Pro előtt	7,5–8,5
Arg-C	Arg↓	Pro előtt	7,5–8,5
Glu-C	Glu↓, (Asp↓)		7,5–8,5
Asp-N	↓Asp, ↓Glu		4,0–9,0
LysArginase	↓Arg, ↓Lys		7,5
**Pepszin	(Ala↓), Phe↓, (Ile↓), Leu↓, Trp↓, Tyr↓		1,0–3,0
ProAlanase	Ala↓, Pro↓		1,0–5,5
CNBr	Met↓		***~1–2
Hangyasav	Asp↓, (Glu↓)		~1–2

↓A nyílak helyzete jelzi, hogy egy adott aminosav előtti vagy utáni kötést hasítja az enzim vagy reagens.

\* Kisebb mértékben, de Pro előtt is előfordulhat hasítás

\*\* Közelebb áll a valósághoz, hogy a pepszin nem specifikus, de adott fehérjére, adott körülmények között jól reprodukálható az emésztés

\*\*\* 0,1%-os sósavban vagy TFA-ban

gátolva a fehérjelánc egyes részeihez való szabad hozzáférést. Ha a fehérjeláncok diszulfidhidakkal össze vannak kötve, az a tömegspektrometriás mérést és az adatbázis-lekeresést is bonyolítja. Ezért ezektől igyekszünk megszabadulni kémiai ágensek segítségével. A diszulfidhidakat a proteolízis előtt redukáljuk, a keletkező szabad cisztein oldalláncokat pedig alkilezéssel védjük a későbbi újraoxidálódástól. Többféle redukáló- és alkilezőszer használatos, a megfelelő kiválasztásánál figyelembe kell venni a minta puffer pH-ját, összetételét stb. (**3.3.** és **3.4. táblázat**).<sup>[10–12]</sup> Az alkilálási lépésnél gyakori mellékreakció az ún. overalkiláció, amikor a cisztenek tiolcsoportjain túl a reaktív aminosav-oldalláncokra (pl. a lizin aminocsoportjára) is kerül alkilcsoport. Illetve, ha megtehetjük, az adott reagenshez kell igazítani a reakcióelegy pH-ját.

Egy másik módosítás, melyet szintén viszonylag könnyű eltávolítani, az aszparagin N-glikozilációja, melyet a PNGáz-F nevű enzim segítségével emésztethetünk le a fehérjéről, miközben az aszparagin aszparaginsavvá alakul. (Az N-glikozilációról külön fejezetben olvashatnak.) Az egyik leggyakoribb poszttranszlációs módosítás, a foszfátcsoport is lehasítható.

**3.3. táblázat.** Redukálószer

Redukálószer	pH
DTT (ditiotreitól)	6,5–9,0 (optimális: 7,0–8,1)
TCEP (tris(2-karboxietil)foszfin)	1,5–9,0
β-merkaptoetanol	



## 3.4. táblázat. Alkilezőszerek

Alkilezőszerek	pH	Additív tömeg	Megjegyzés
IAM (jód-acetamid)		57,021464 H(3) C(2) N O	glicinnel megegyezik az additív tömeg, overalkiláció lehetséges, mellékreakciók is (N-term, Lys, His, Met, Asp)
IAA (jód-ecetsav)		58,005479 H(2) C(2) O(2)	
NEM (N-etilmaleimid)	6,5–7,5	125,047679 H(7) C(6) N O(2)	sok mellékreakció (Lys, His, N-term)
CA (klór-acetamid)		57,021464 H(3) C(2) N O	glicinnel megegyezik az additív tömeg, nem jellemző overalkiláció
4-VP (4-vinilpiridin)		105,057849 H(7) C(7) N	lassan reagál, és a fehérjét jelentősen hidrofóbbá teheti!
AA (akrilamid)		71,037114 H(5) C(3) N O	karcinogén / alanin tömegével megegyezik az additív tömeg
MMTS (metil-metán-tioszulfonát)	7–8	45,987721 H(2) C S	reverzibilis, kellemetlen szagú

tó alkalikus foszfatázzal a fehérjéről, azonban ezt csak nagyon speciális esetekben alkalmazzák, mivel zavaró hatása nem jelentős.

## Fehérjeprecipitáció – oldatban emésztés

Ha a fehérje mennyiségében nem szűkölködünk, akkor *fehérjeprecipitációval* megszabadulhatunk a lízispuffer összetevőitől, és az így kapott fehérjepelletet (csapadékot) a következő lépéshez alkalmas pufferben oldjuk majd fel. A precipitációt végezhetjük redukálás és alkilezés után, így azok reagensfeleslegétől is megszabadulunk. Több módja is van a fehérjekicsapásnak.<sup>[13]</sup> Történhet szerves oldószerrel/oldószerkeverékkel (aceton, kloroform-metanol, metanol-diklórmétán-víz), savval (triklórecetsav (TCA)<sup>[14]</sup>) vagy sóval (ammónium-szulfátos kisózás). Legalább hatszoros térfogatnyi szerves oldószert adunk a fehérjeeleggyhez, és jégen vagy -20 °C-on legalább 1–2 órán át inkubáljuk. Centrifugálás után óvatosan eltávolítjuk az oldószert, és néhány perc száradás után megkapjuk a fehérje csapadékot. Sok szerves oldószerben oldódó komponenstől megszabadulunk így, de fehérjevesztéssel is számolni kell, és a pelletet nem mindig tudjuk maradéktalanul visszaoldani a proteolízishez optimális pH-jú vizes pufferben (pl. 50 mM TEAB, 50 mM ammónium-bikarbonát vagy Hepes pH 8,5). Az oldást MS kompatibilis felületaktív anyaggal segíthetjük (pl. Rapigest, ProteaseMax). Ezután hozzáadjuk a proteázt kb. 1:50 (súlyarány) enzim:fehérje arányban. Az inkubálási hőmérséklettől függően 1–16 órán keresztül folytatjuk az enzimátikus emésztést. Tripszin esetén jellemzően 37 °C-on 4–12 órát szoktunk emésztetni. Hosszú inkubációs idő, illetve nem megfelelően beállított enzim/szubsztrát arány esetén több autolízis termékre, illetve több nonspecifikus hasításra számíthatunk. A hidrofób fehérjék nem szeretik a dehidratálódást, nehezen vagy egyáltalán nem mennek oldatba detergens hozzáadása nélkül. Néha még úgy sem. Ha esetleg nem sikerül visszaoldani maradéktalanul a fehérjecsapadékot, az inkubáció alatt részben a magasabb hőmérséklet, részben az enzim hatására többnyire minden feloldódik.

## Fehérjék elválasztása gélben, gélben emésztés

A minta feltárása, a fehérjék kivonása után további tisztítási, szeparálási lépéseket lehet beiktatni. Így pl. egy- vagy kétdimenziós poliakrilamidgél-elektroforézissel fehérjeszinten frakcionálhatjuk a mintát, vizualizálhatjuk, kiválaszthatunk belőle egyes fehérjesávokat, -pöttyöket további analízisre. Nagy előnye a gélelektroforézisnek, hogy ha a gél MS-kompatibilis festékekkel, illetve festési protokollal festjük, akkor ezután minden további nélkül alkalmas a minta gélben történő emésztésre és MS-analízisre, függetlenül annak előéletétől, azaz ezzel kivédjük a zavaró komponensek okozta komplikációt. Azonban, ha a fehérjelízis-puffer guanidint tartalmazott, akkor közvetlenül nem tudunk SDS-gélelektroforézist végezni, mert a guanidin és az SDS kicsapják egymást.

Egy 20×20 cm-es kétdimenziós gélre kb. 200–800 g-nyi fehérjét szoktak felvinni, ami akár 2000 detektálható fehérjepöttyre válik szét. Az első dimenzió az izoelektromos fókuszálás, ami a fehérjéket izoelektromos pontjuk szerint egy *pH*-grádiens mentén szeparálja, a fehérjék elektromos erőterben az izoelektromos pontjuknak megfelelő *pH*-jú pozícióba vándorolnak. Ha elérték ezt a helyet, mivel nettó töltésük nulla lesz, nem vándorolnak tovább. Nem minden fehérje alkalmas izoelektromos fókuszálásra, a nagyon savas vagy a nagyon bázikus fehérjéket nem lehet így gélre vinni, a membránfehérjéket pedig nehéz oldatban tartani, ennek elősegítése érdekében nemionos detergenset alkalmazhatunk.

Második dimenzió az SDS (nátrium-dodecilszulfát) poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE), ami ugyanaz, mint az egydimenziós SDS-PAGE (poliakrilamid gélelektroforézis). Itt a mintapuffer ionos detergenst, SDS-t tartalmaz, ami biztosítja, hogy minden fehérjelánc kitekeredjen és a lánc hosszával arányos mennyiségű extra negatív töltést vegyen fel. Elektromos erőterben a negatív töltésű, kitekeredett fehérjeláncok az anód felé vándorolnak a térhálós gélben, a vándorlás sebessége a töltéssel arányos. A mintapuffer rendszerint redukálószer is tartalmaz, így végső soron a fehérjék lineárisak, molekulatömegük arányos a lánchosszukkal, ami pedig a töltésükkel korrelál, azaz relatív mobilitásukból a molekulatömegükre következtethetünk. További részleteket a kétdimenziós elektroforézisről *14. fejezetben* olvashatnak.

A gélen, legyen az akár egy- vagy kétdimenziós, az elválasztott fehérjéket festéssel tesszük láthatóvá. Leggyakrabban az MS kompatibilis Coomassie Brilliant Blue festéket használunk, de meg kell említeni az ezüsfestést és a sokkal érzékenyebb fluoreszcens festési eljárásokat is. Az Ag festésnek is van olyan változata, ami megfelel a további gélben emésztéshez,<sup>[15]</sup> de a glutaraldehidet tartalmazó protokollt ne használjuk, mert az a fixálás során a gélben keresztköti a fehérjéket, ami megakadályozza a fehérje emésztését és a peptidok extrakcióját! Fluoreszcens festékek lehetnek MS kompatibilisek, de a detektálás sokkal bonyolultabb, külön műszerezettséget igényel.

Ha a gélekből tömegspektrometriával szeretnénk fehérjét azonosítani, akkor feltétlenül figyelmet kell fordítani a következőkre: Gondosan mosogassunk a gélfuttatás előtt, bánjunk kesztyűs kézzel az oldatokkal, eszközökkel! Érdemes púdermentes laboratóriumi gumikesztyűt használni, mert abból kevesebb fehérje oldódik ki. Tapasztalataink szerint azokból a fehérjepöttyökből, -sávokból, melyek Coomassie festés után akár csak halványan is látszanak, biztosan tudunk fehérjét azonosítani, de nem mindegy, mennyi szennyező fehérje mellett! A gélminták különösen ki vannak téve a külső szennyezéseknek, mint a keratin, ami a bőrünkről, a hajunkról, a pulóverünkől, de akár a labor levegőjéből is származhat. A laborban nagy mennyiségben használt fehérjék, mint az albumin, a kazein szintén könnyen elszennyezhetik a gélmintákat, ezért különítsük el az MS-re készülő gélek edényzetét, azt ne használjuk másra. A géldokumentációs eszköz (scanner) is jelentős szennyezőforrás lehet!

**Gélben emésztés.** A fehérjék gélben emésztése jól standardizált folyamat. Számos jól működő protokollt találunk erre. Mi a UCSF Proteomikai laborjának útmutatóját javasoljuk: <https://msf.ucsf.edu/protocols.html>.

A gélben emésztés számos lépésből áll, ezért érdemes a műveleteket kesztyű és karvédő használatával, túlnyomásos fülkében végezni a szennyeződések elkerülése érdekében.

*Lépései a következők:*

1. A fehérjét tartalmazó géldarabkát a lehető legkevesebb „üres” géllel vágjuk ki és kockázzuk össze (kb. 1 mm<sup>3</sup>-nyi kockákra), hogy a gél felületét megnöveljük.
2. A Coomassie festéket és az SDS-t 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/50% acetonitril oldattal történő mosással távolítjuk el a gélből, miközben az dehidratálódik, zsugorodik.
3. Teljes dehidratálás vákuumcentrifugában.
4. Redukálás: a redukálószer 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> vizes oldatában adjuk a gélhez, ennek hatására rehidratálódik a gél, „beszippantja” a redukálószer (56 °C, 30 perc).
5. Alkilezés (sötétben szobahőn, 30 perc).
6. Az előző reagensek eltávolítása a gélből, és újabb dehidratálás.
7. Az enzimdattal hidratáljuk a gél, így az bekerül a gél belsejébe. Ezt a lépést 4 °C-on végezzük 15 percig, hogy megakadályozzuk az enzim autolízisét. A maradék enzimdattot eltávolítjuk, 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pufferrel pótoljuk. Mivel nem igazán tudjuk megbecsülni a gélben lévő fehérje mennyiségét, a tripszint nagy feleslegben adjuk a gélhez: 100 ng tripszin akár 10 µg fehérje emésztéséhez is elegendő.
8. 37 °C-on 4–16 órán keresztül inkubáljuk a mintát.
9. A keletkezett peptideket a gél dehidratálása közben extraháljuk, ráztatás, szonikálás szerves oldószer (50% ACN/5% hangyasav) segítségével.

## GASP, FASP, SP3

Az 1D és 2D gélelektroforézissel elválasztott minták mellett gélben emésztést alkalmazunk a géllel segített minta-előkészítés esetén is (*GASP, Gel-aided sample preparation*). Ebben az esetben kis térfogatú mintákat (3–5 µl) – mintapuffer összetételétől függetlenül –, egy poliakrilamid géldugóba zárjuk és a fenti protokoll szerint dolgozunk vele tovább. Ez átmenet a gélalapú és az oldatalapú minta-előkészítés között, hiszen a gél nem használjuk a komponensek szétválasztására, csak a fehérjék immobilizálására, ami elősegíti a felesleges reagensek, vegyszerek eltávolítását az emésztés előtt.

Detergenseket tartalmazó mintapufferben levő minták feldolgozására dolgozták ki a *FASP módszert*. Ennek során a mintát redukálás, alkilezés és megfelelő hígítás után egy 10–50 kDa-os centrifugális molekulatömeg-szűrő membránra (pl. Centrikon) viszik fel, majd puffercserével eltávolítják a detergenseket. A membránon végzett enzimikus emésztéssel nyert peptidegység tisztá csőbe centrifugálható.

Viszonylag kis mennyiségű (<100 µg) minták emésztéséhez dolgozták ki az *SP3 módszert*. Redukálás, alkilezés után a fehérjéket szerves oldószer segítségével karboxil funkciók csoportokat hordozó mágneses gyöngyre kényszerítik, majd 80% szerves oldószerrel mosás, így minden zavaró pufferalkotó eltávolítható a fehérjék mellől, akár még olyan detergensek is, melyek más módszerrel nem (pl. Triton X100, Tween 20, NP-40).<sup>[16]</sup> Az emésztés a gyöngyön zajlik, majd a gyöngy mágnessel történő immobilizálása után a felülúszóban levő peptidek pipettával egyszerűen összegyűjthetők.

Amikor a mintákból kivont fehérjé(k)ből végre peptidkeveréket állítottunk elő, már majdnem készen vagyunk. A tömegspektrometriás analízishez a peptidegységet a mintabevitelre alkalmas formára kell hozni. Ha kénytelenek voltunk detergenst vagy más denaturáló

szert, esetleg nagyobb sókoncentrációt alkalmazni az emésztés során, akkor itt a megfelelő tisztító/sótalanító lépés következik. MS-barát emésztési körülmények után csupán az on-line frakcionáláshoz kell alkalmazkodni.

### Minta-előkészítés intakt fehérjeanalízishez, „top-down” megközelítés

A minta fehérjetartalmát emésztés nélkül fogjuk tömegspektrometriánál analízálni, így a fehérjék, fehérjekomplexek intakt tömegét tudjuk meghatározni. A módszerrel az ún. *proteoformákat*, sőt megfelelő körülmények között a nemkovalens kölcsönhatásokat is karakterizálhatjuk.<sup>[17,18]</sup>

**Proteoformáknak** nevezzük egy adott gén termékeit, beleértve a genetikai polimorfizmusokat, mutációkat, az alternatív hasításokat és a poszttranszlációsán módosított formákat is.

*Top-down* megközelítés esetén, attól függően, hogy mi a vizsgálat célja, dolgozhatunk natív vagy denaturált fehérjékkel. Ha egyetlen fehérje pontosabb megismerése a célunk, akkor azt a fehérjét az MS analízis előtt homogenitásig kell tisztítani! Bonyolult keverékek, komplex fehérjeelegyek nem alkalmas erre a célra. Ha a célunk a fehérje azonosítása, intakt tömegének meghatározása, akkor denaturálhatjuk a mintát, a szekvencia információ nem szenved csorbát ezáltal. Rekombináns fehérjék gyors minőségellenőrzését elvégezhetjük így, a minta direkt injektálásával.<sup>[19]</sup>

Bizonyos esetekben, ha szerkezeti biológiai kérdésünk van, vagy fehérje-fehérje, vagy fehérje-ligandum kölcsönhatást kívánunk vizsgálni, fontos, hogy a fehérje megtartsa natív konformációját a mérés során. Ekkor direkt injektálással valamilyen illékony pufferben, semleges pH-n juttatjuk be a fehérjét a tömegspektrométerbe. Használhatunk pl. ammónium-acetátot vagy ammónium-bikarbonátot fiziológiás pH-n. Detergenst nem tartalmazhat a puffer és a sókoncentráció is nagyon limitált lehet. Az intakt fehérjét nagy felbontású, pontos tömegmérésre alkalmas, kiterjesztett detektálási tömegtartományú műszerrel érdemes vizsgálni, azonban még az így meghatározott „pontos” molekulatömeg sem ad elegendő információt arra, hogy biztosan azonosítsuk a fehérjét. Viszont gázfázisú fragmentációval értékes szekvenciaionokat kaphatunk, viszonylag magas szekvencia-lefedettséget elérve, ami a fehérje azonosításához vezethet.<sup>[20]</sup> Különböző komplexitású fehérjekeverékeket általában *on-line* frakcionálással összekötve vizsgálnak, de egy gyors kromatográfiás *on-line* tisztítás következményeként az egyes fehérjék analízise is sikeresebb lehet (*bővebben a Kromatográfiáról szóló 4. fejezetben*).

A tömegspektrometriai laborok általában központi, szolgáltató laborként működnek, gyakran nem képezik szerves részét a biológiai/orvosi kutatócsoportoknak, és helyileg is elkülönülnek egymástól. Fontos, hogy a minták megfelelő állapotban a megfelelő információkkal jussanak el az analitikai laboratóriumba.

*Gélmintákat* nem szabad sem kiszárítani, sem lefagyasztani, és az sem jó, ha befertőződnek. Ezért legjobb frissen, desztillált vízben, esetleg 0,1–1% ecetsavban szállítani és tárolni, lehetőleg 4 °C-on. Általánosságban azt mondhatjuk, hogy ha SDS gélen Coomassie festéssel vizualizálható egy folt, akkor biztosan lehet belőle fehérjét azonosítani tömegspektrometriával.

*Oldatmintákat*, mint fentebb is említettük, fagyasztva kell tárolni és szállítani, legalább jégakkal, de legjobb szárazjégben megoldani a transzfert. Liofilizálással stabilabbá tehetjük a molekulákat, ugyanakkor érdemes minimalizálni az olvasztási/fagyasztási ciklusok szá-

mát, amit a megfelelő porciózással érhetünk el. Az analízishez szükséges mintamennyiségekről mindenképpen érdemes előre egyeztetni az analitikusokkal.

### Ajánlott irodalom

1. von Hagen J. (ed.) *Proteomics Sample Preparation*. Weinheim, John Wiley & Sons, 2008. (ISBN 978-3-527-31796-7)
2. Ivanov AR and Lazarev AV. (eds.) *Sample Preparation in Biological Mass Spectrometry*. Springer, 2011. (doi 10.1007/978-94-007-0828-0)
3. Mirzaei H and Carrasco M. (eds.) *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications*. Springer, 2016. (doi 10.1007/978-3-319-41448-5)
4. Faktor J, Goodlett DR, and Dapic I. Trends in Sample Preparation for Proteome Analysis. In: Mitulović, G (ed.) *Mass Spectrometry in Life Sciences and Clinical Laboratory*. Rijeka, IntechOpen, 2021. (doi 10.5772/intechopen.95962)
5. Suder P, Novák P, Havlíček V, et al. General Strategies for Proteomic Sample Preparation. In: Ciborowski P, Silberring J.(eds), *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (2nd Edition)*, Boston, Elsevier, 2016; 25-49. (doi 10.1016/B978-0-444-63688-1.00003-3)
6. Hubner NC, Bird AW, Cox J, et al. Quantitative proteomics combined with BAC TransgeneOmics reveals in vivo protein interactions. *J Cell Biol*, 2010; 189(4):739-54. (doi: 10.1083/jcb.200911091.)
7. Fischer R, Kessler BM. Gel-aided sample preparation (GASP)—a simplified method for gel-assisted proteomic sample generation from protein extracts and intact cells. *Proteomics*, 2015; 15(7):1224-9. (doi: 10.1002/pmic.201400436.)
8. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 2009; 6(5):359-62. (doi:10.1038/nmeth.1322)
9. Hughes CS, Moggridge S, Müller T, et al. Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nat Protoc*, 2019; 14(1):68-5. (doi: 10.1038/s41596-018-0082-x.)
10. Suttapitugsakul S, Xiao H, Meekens J, et al. Evaluation and optimization of reduction and alkylation methods to maximize peptide identification with MS-based proteomics. *Mol Biosyst*, 2017; 13(12):2574-82. (doi:10.1039/c7mb00393e)
11. Müller T, Winter D. Systematic Evaluation of Protein Reduction and Alkylation Reveals Massive Unspecific Side Effects by Iodine-containing Reagents. *Mol Cell Proteomics*, 2017; 16(7):1173-87. (doi: 10.1074/mcp.M116.064048.)
12. Evans CA. Reducing Complexity? Cysteine Reduction and S-Alkylation in Proteomic Workflows: Practical Considerations. In: Evans C, Wright P, Noirel J. (eds) *Mass Spectrometry of Proteins. Methods in Molecular Biology*, vol 1977. New York, Humana Press, 2019; 83-97. (doi 10.1007/978-1-4939-9232-4\_7)
13. Jiang L, He L, Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J Chromatogr A*, 2004; 1023(2):317-20. (doi:10.1016/j.chroma.2003.10.029)
14. Wessel D, Flügge UI. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, 1984; 138(1):141-3. (doi:10.1016/0003-2697(84)90782-6)
15. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, 1996; 68(5):850-8. (doi:10.1021/ac950914h)
16. Moggridge S, Sorensen PH, Morin GB ,et al. Extending the Compatibility of the SP3 Paramagnetic Bead Processing Approach for Proteomics. *J Proteome Res*, 2018; 17(4):1730-40. (doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00913.)
17. Leney AC, Heck AJR. Native Mass Spectrometry: What is in the Name?. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2017; 28(1):5-13. (doi:10.1021/jasms.8b05378)
18. Skinner OS, Haverland NA, Fornelli L, et al. Top-down characterization of endogenous protein complexes with native proteomics. *Nat Chem Biol*, 2018; 14(1):36-41. (doi:10.1038/nchembio.2515)
19. Gan J, Ben-Nissan G, Arkind G, et al. Native Mass Spectrometry of Recombinant Proteins from Crude Cell Lysates. *Anal Chem*, 2017; 89(8):4398-404. (doi:10.1021/acs.analchem.7b00398)
20. Schmitt ND, Berger JM, Conway JB, Agar JN. Increasing Top-Down Mass Spectrometry Sequence Coverage by an Order of Magnitude through Optimized Internal Fragment Generation and Assignment. *Anal Chem*, 2021; 93(16):6355-62. (doi:10.1021/acs.analchem.0c04670)

## 4. KROMATOGRÁFIA

Janáky Tamás,  
Szabó Zoltán

Amint azt a 2. fejezetben bemutattuk, a proteomika egy biológiai rendszerben (sejt, szövet, szerv, organizmus, testfolyadék stb.) előforduló összes fehérje (proteom) tulajdonságainak vizsgálatával foglalkozó tudományterület. Többek között meg kívánja ismerni a rendszerben lévő fehérjék különböző szintű szerkezetét (elsősorban aminosav-szekvenciáját), a mutációk során képződő új szekvenciákat, a polipeptidláncban található poszttranszlációs módosításokat, a fehérjék sejtszintű lokalizációját, valamint azok koncentrációit, illetve koncentrációváltozásait egy adott történés során. Minden korszerű analitikai módszer célja, hogy minél nagyobb számú és minél kisebb anyagmennyiségű mintából, minél gyorsabban és minél több információt adjon a benne lévő összetevőkről. Ez azt jelenti, hogy az analitikai módszerek érzékenynek, nagy felbontásúnak, nagy áteresztőképességűnek és megbízhatónak kell lennie. A fenti tulajdonságok meghatározására napjainkban a legalkalmasabb módszer a nagyhatékonyságú elválasztástechnikával kapcsolt nagyfelbontású tömegspektrometria, mert femtomolnyi (néha attomolnyi) mintából akár 10 000 fehérje is azonosítható, és koncentrációja is meghatározható.

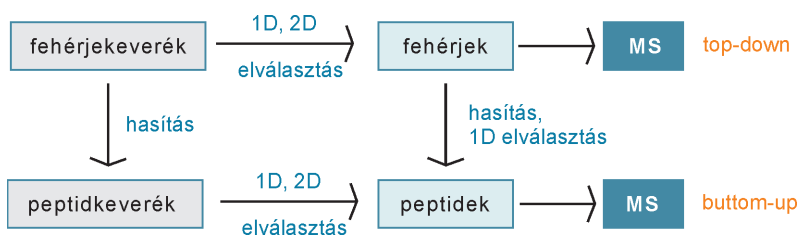
A tömegspektrometrián alapuló bottom-up proteomikai módszerek lényege (lásd 2. fejezet), hogy a biológiai mintában lévő fehérjéket kisebb egységekre, peptidre bontjuk, majd tömegspektrometriás módszerekkel meghatározzuk azok pontos tömegét, aminosav-szekvenciáját és a rajtuk lévő esetleges módosításokat. Egy hat vagy több aminosavból álló peptid szekvenciája egy organizmus proteomján belül annyira egyedi lehet, hogy meghatározásával genom/fehérje adatbázisok segítségével azonosítható egy adott fehérje. Természetesen azonos hexapeptid-szekvenciák a proteom különböző fehérjeiben is előfordulhatnak, azonban ezek a találatok tipikusan hasonló fehérjék konzervált régióiból származnak. Ezért, ha egy fehérje két vagy több peptidjének sikerül a szekvenciáját meghatározni, az nagyban növeli a fehérje azonosításának valószínűségét, megbízhatóságát.

A proteomikai analízisben a problémák a mintával kezdődnek. A biológiai minták szerves és szervetlen sókon kívül tartalmazhatnak kismolekulájú szerves vegyületeket (savakat, aminosavakat, mono- és diszacharidokat, lipideket, nukleotidokat stb.) valamint biopolimereket (peptideket, fehérjéket, nukleinsavakat, oligo- és poliszacharidokat stb.). A fehérjéken kívül a mintában lévő összes többi komponens feleslegesen terheli az analitikai rendszert, ezért valamilyen elválasztástechnikai módszerrel (szűrés, centrifugálás, szilárd fázisú extrakció, elektroforézis stb.) célszerű megszabadulni tőlük. A minta-előkészítés utáni fehérjekeverék még mindig rendkívül komplex, mert az adott organizmus genomja által kifejezett fehérjék száma, a splice variánsok és a poszttranszlációs módosítások miatt sokszorozódik. Az egyes fehérjék molekulatömege néhány ezertől több millióig, relatív gyakoriságuk 10–1 000 000 kópia/sejtig is terjedhet, valamint koncentrációtartományuk gyakran a 10 nagyságrendet is meghaladja. Bár a tömegspektrométerek érzékenysége, sebessége, felbontóképessége az elmúlt 10 évben óriási mértékben növekedett, ilyen bonyolult összetételű minták vizsgálatára nem képesek. Amennyiben bottom-up típusú analízissel kívánjuk a mintánkat analizálni, tovább növekszik a vizsgálandó komponensek száma, mert a fehérjéket peptidre bontjuk, melyek száma a fehérje nagyságától és a hidrolízis módjától függően



akár százszoros is lehet. Ha pl. átlagosan 15 peptidre hasítunk szét egy fehérjét, akkor az egy sejtben lévő kb. 10 000 fehérjéből 150 000 peptid, a vérplazma kb. 100 000 fehérjéből akár 1 500 000 peptid is képződhet. A legkorszerűbb tömegspektrométerek szekvenciaadatokat tudnak adni néhány 10–100 komponensből álló peptidkeverékből, azonban a fenti bonyolultságú rendszerek közvetlen vizsgálata reménytelen. Ahhoz, hogy a keverék minél több komponenséről adatot tudjunk gyűjteni, egyszerűsíteni kell a tömegspektrométerbe egy adott időpillanatban bejutó minta komplexitását, azaz csökkenteni a vizsgálandó komponensek számát.

Számos technikát lehet alkalmazni összetett fehérjekeverékek szétválasztására, de nem mindegyikük alkalmas a proteomikai vizsgálatokhoz. A peptidek, fehérjék fizikai tulajdonságait (méret, alak, töltés, izoelektromos pont, hidrofóbicitás, hidrofilitását stb.), kémiai reakcióit (komplekxképzés, immobilizáció stb.), biológiai kölcsönhatásait (pl. antigén-antitest, glikoprotein-lektin stb.) kihasználva frakcionálni lehet a vizsgálati mintát, mérsékelve ezzel az egyes frakciók összetettségét. Nagyon fontos, hogy az utolsó lépésben használt frakcionálási eljárásnak kompatibilisnek kell lennie a későbbi tömegspektrometriás elemzéssel!



4.1. ábra. Fehérjekeverékek vizsgálata

A *top-down* típusú proteomikai analízis során egy- vagy kétdimenziós nagyhatékonyságú kromatográfiával elválasztott fehérjét/fehérjéket vezetjük be a tömegspektrométerbe, és analizáljuk az éppen bejutó komponent.

A *bottom-up* típusú vizsgálat során két lehetőség van a fehérjéből készült peptidkeverékek komplexitásának csökkentésére:

- az első lépésben elektroforetikus vagy kromatográfiás módszerekkel elválasztjuk, illetve frakcionáljuk a fehérjéket, majd az egyes fehérjesávokban/foltokban vagy frakciókban lévő fehérjéket peptidekre bontjuk, és nagyhatékonyságú kromatográfiával elválasztjuk azokat.
- a fehérjekeverékben lévő összes fehérjét elhidrolizáljuk, majd a kapott peptidkeveréket egy- vagy többdimenziós nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával szeparáljuk.

Természetesen, az ily módon analizált minták esetében sem érhető el, hogy a folyadékkromatográfiával on-line kapcsolt tömegspektrométerbe egyszerre csak egy peptid/fehérje jusson be, azonban nagy az esély rá, hogy a minta számos komponensét azonosítani lehet.

Intakt fehérjék elválasztására leggyakrabban alkalmazott eljárások az izoelektromos fókuszálás, az egy- és kétdimenziós poliakrilamid-elektroforézis (PAGE), kromatofókuszálás, valamint a különböző nagyhatékonyságú kromatográfiás módszerek. Az elektromigráción alapuló eljárások közül a legjobb, legnagyobb hatékonyságú elválasztást a 2D-PAGE nyújtja, akár 1000–4000 fehérje is kimutatható (lásd 14. fejezet). Közismert azonban, hogy a fejlesztések ellenére 2D-PAGE alapú módszerek számos technikai korláttal küzdenek: a na-

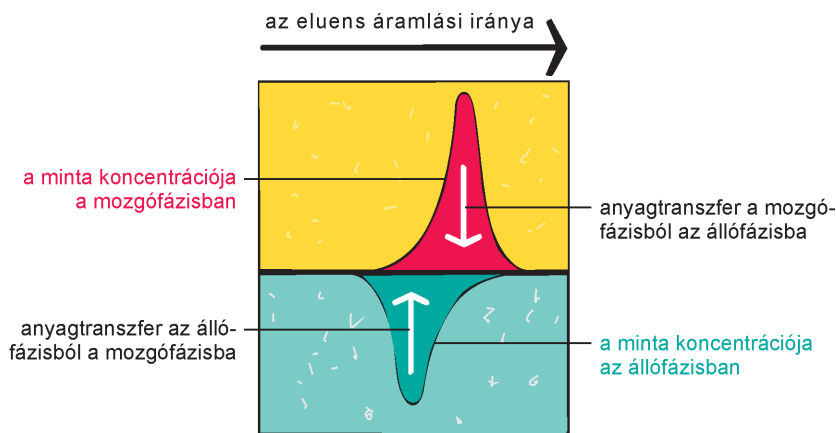
gyon savas vagy bázikus, valamint az erősen hidrofób membránfehérjék nem vagy korlátozottan detektálhatók; érzékenysége és a dinamikus tartománya limitált; lassú és nem automatizálható, valamint reprodukálhatósága is hagy kívánnivalót maga után.

Nagy felbontóképessége, jó reprodukálhatósága és az elektropray tömegspektrometriával való kompatibilitása miatt a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) és az ultranagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (UHPLC) vonzó alternatívája a 2D-PAGE-nek a fehérjék és peptidok elválasztására. A folyadékkromatográfia másik előnye az elválasztást biztosító kölcsönhatások típusainak széles választéka. Ezen tulajdonságok következtében a folyadékkromatográfia a proteomika sokoldalú, alapvetően fontos eszközévé vált a minta-előkészítéstől a peptidok LC-MS-sel történő analíziséig.

### A kromatográfia elve

A kromatográfia egy elválasztástechnikai eljárás, melyben a minta komponenseinek elválasztása két, egymással érintkező fázis közötti megoszláson alapul. Ellentétben az egyéb megoszláson alapuló elválasztási módszerekkel (pl. folyadék-folyadék extrakció), a kromatográfia során az elválasztásban részt vevő fázisok közül az egyik helyhez kötött (álló vagy stacionárius fázis), a másik egyirányú egyenletes mozgásban van (mobil vagy mozgófázis). A folyamatosan adagolt mozgófázis biztosítja a minta komponenseinek áthaladását az állófázison. A mozgófázisba beadott mintakomponensek amint érintkezésbe lépnek az állófázissal, a molekulaszerkezet és az intermolekuláris erők által meghatározott relatív affinitásuk, valamint az álló- és mozgófázis tulajdonságai által vezérelve megoszlanak a két fázis között. A komponensek előrehaladása az álló- és mozgófázis között folytonosan ismétlődő, dinamikus szorpciós-deszorpciós lépéseken keresztül valósul meg, azaz a komponensek megkötődnek, majd deszorbeálódnak, majd megint megkötődnek, megint deszorbeálódnak és így tovább, amíg el nem hagyják az állófázist. Az állófázison bekövetkező szorpció-deszorpció hajtóereje az, hogy egy adott komponens álló- és mozgófázis között beálló egyensúlyát a mozgófázis elmozdulása megzavarja, anyagátadás indul meg az állófázisból a mozgófázisba, illetve a mozgófázisból az állóba, amíg az új egyensúly be nem áll, majd a folyamat ismétlődik (4.2. ábra).

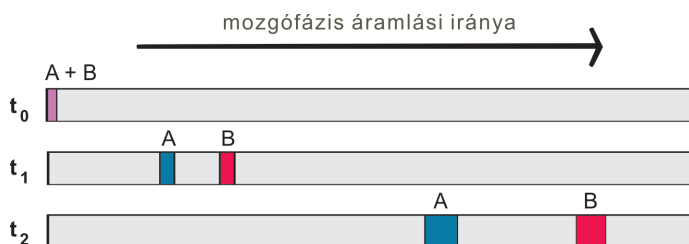
Bár igazi egyensúly a mozgófázis áramlása miatt sohasem alakul ki a fázisok között, a mozgófázis sebességének, a mozgó- és állófázis tulajdonságainak helyes megválasztásával



4.2. ábra. A kromatográfia alapja: kvázi-stacionárius egyensúlyi megoszlás a két fázis között



egy ahhoz nagyon közeli állapotot lehet elérni, amikor is a komponensek két fázis közötti megoszlásának folyamata kellően gyors az áramlási sebességhez képest. Ennek az ún. kvázi-stacionárius egyensúlynak leírására alkalmas a termodinamikai megoszlási hányados ( $K$ ), ami a komponens állófázisban és a mozgófázisban lévő koncentrációinak ( $C_s$  és  $C_m$ ) hányadosaként adható meg ( $K = C_s / C_m$ ). A megoszlási hányados vagy megoszlási konstans az anyagokra jellemző fizikai tulajdonság, ami csak az analit szerkezetétől, az álló- és mozgófázis természetétől és a hőmérséklettől függ.



**4.3. ábra.** A minta komponenseinek kromatográfiás elválasztása ( $t_2 > t_1$ )

A **4.3. ábra** bemutatja egy  $t = 0$  időpontban a mozgófázisba impulzusszerűen beadott kétkomponensű (**A** és **B**) minta viselkedését. Az állófázissal érintkezve a komponensek a megoszlási hányadosuknak megfelelő koncentrációviszonyokat alakítanak ki a két fázisban. Az **A** komponens nagyobb affinitással rendelkezik az állófázishoz ( $K_A > K_B$ ), ezért nagyobb lesz az állófázisbeli koncentrációja, mint a **B** komponensé, illetve fordítva, a **B** komponens mozgófázisbeli koncentrációja nagyobb lesz, mint az **A**-é. Amikor a komponensek molekulái a mozgófázisban vannak, akkor vele azonos sebességgel mozognak, azonban azok a molekulák, melyek éppen az állófázishoz kötődnek, azok pillanatnyi sebessége nulla. A folyamatosan kialakuló egyensúly következtében az állófázishoz gyengébben kötődő komponensek gyorsabban (**B**), míg a nagyobb affinitással kötődőek (**A**) lassabban vándorolnak, azaz jobban visszatartódnak (retenció). Ez a különbség az idő előrehaladtával ( $t_2 > t_1$ ) egyre nagyobb lesz, így a komponensek elválnak egymástól.

## Kromatogram

Ha az állófázist a mozgófázissal elhagyó komponensek bizonyos fizikai-kémiai tulajdonságát (pl. abszorbanancia, fluoreszcencia) folyamatosan detektáljuk, akkor a detektorjelet az idő függvényében ábrázolva megkapjuk a kromatogramot. A kromatogramokból mind minőségi, mind mennyiségi információkat is kaphatunk az egyes komponensekre nézve. A **4.4A ábrán** látható az előző kétkomponensű minta teoretikus kromatogramja. Ideális esetben a lineáris elúciós kromatográfia során az egyes komponensek Gauss- (normál) megoszlási görbéknek megfelelő koncentrációprofilok csúcsok formájában jelennek meg a kromatogramon. A csúcsok (kromatogramról meghatározható) különböző jellemzőiből – mint időbeli helyzetük, alakjuk, szélességük, magasságuk – számos új paraméter származtatható, amelyek a kromatográfiás rendszerre, az elválasztás „jóságára”, az álló- és mozgófázisban lejátszódó folyamatokra, a komponensek fizikai-kémiai tulajdonságaira, illetve mennyiségükre vonatkozólag szolgáltatnak információt. Ezen paraméterek kapcsolatát a különféle fizikai és kémiai állandókkal, valamint a komponensek anyagi jellemzőivel a kromatográfia elmélete tárgyalja.

**A kromatográfiás csúcsok jellemző adatai:**

**holtidő ( $t_M$ ,  $t_0$ ):** az állófázissal kölcsönhatásba nem lépő komponens, v. inert oldószer retenciósi ideje

**holtterfogat ( $V_M$ ,  $V_0$ ):** az oszlopon belüli mozgó fázis térfogatának és a kromatográfiás rendszer (injektor, detektor, összekötő kapillárisok) térfogatának összege

**retenciósi idő ( $t_R$ ):** a minta bejuttatásától a csúcsmaximum megjelenéséig eltelt idő

**csúcsmagasság ( $h$ ):** a csúcs maximuma és az alapvonal közötti távolság

**csúcsszélesség ( $w_b$ ):** a csúcsok alapvonalon mért szélessége,  $w_b = 4\sigma$

**félértéksszélesség ( $w_{1/2}$ ,  $w_h$ ,  $FHWM$ ):** a csúcsmagasság felénél ( $h/2$ ) mért csúcsszélesség

$\sigma$ : a Gauss-görbe standard deviációja

**A kromatográfiás elválasztás származtatott paramétereit:**

**csúcs alatti terület ( $A$ ):**  $A \approx h \times w_{1/2}$

**csúcskapacitás:** a kromatográfiás ablakban (első és utolsó csúcs retenciósi idejének különbsége ( $t_{R,n} - t_{R,1}$ )) elválasztható komponensek száma (grádiens elúciónál  $w$  közel állandó)

$$n_c = \frac{t_{R,n} - t_{R,1}}{w}$$

**elméleti tányérszám (vagy tányérszám,  $N$ ):** a kromatográfiás oszlop hatékonyságának (csúcsszélesedés) mérőszáma

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w} \right)^2 = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

**elméleti tányérszám magasság ekvivalens ( $H$ ,  $HETP$ ):** egy elméleti tányérnak megfelelő oszlophossz

$$H = \frac{L}{N},$$

ahol  $L$  az oszlop hossza,  $N$  az elméleti tányérszám

**felbontás ( $R_s$ ):** két egymást követő csúcs relatív elválasztásának mértéke

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(w_1 + w_2)}; \text{ vagy } R_s = \frac{1}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{k + 1} \sqrt{N}$$

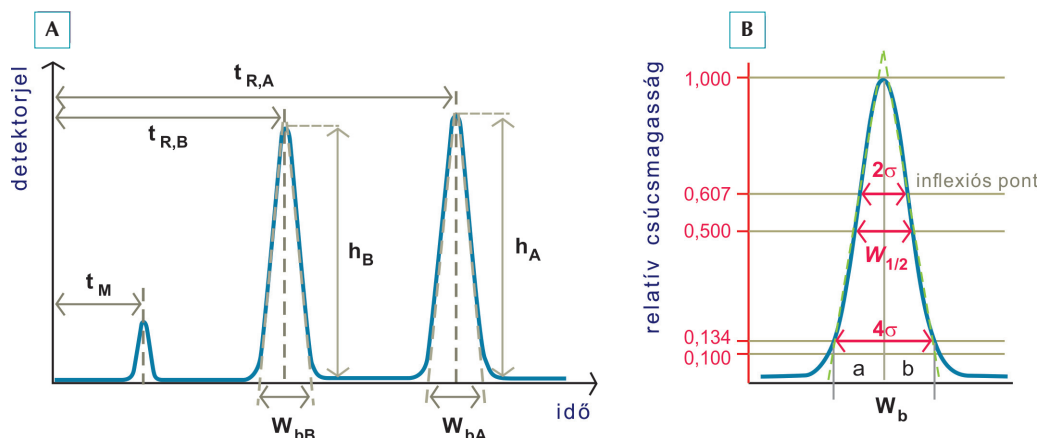
**retenciósi tényező (retenciósi faktor,  $k$ ):** egy adott kromatográfiás rendszerben a vizsgált komponens jellemző fizikai adata; az álló- és a mozgó fázisban lévő komponens mólaránya; kifejezhető a retenciósi idővel, ill. térfogatokkal

$$k = \frac{n_s}{n_m} = \frac{C_s \cdot V_s}{C_m \cdot V_m} = K \cdot \frac{V_s}{V_m} \quad k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

**szelektivitás ( $\alpha$ ):** két egymást követő csúcs elválasztásának mértéke adott álló- és mozgófázis esetén

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{k_2}{k_1}$$

A kromatográfiás módszerek csoportosíthatók a fázisok halmazállapota, az állófázis alakja, mérete, a kifejlesztés módja és az elválasztási mechanizmusa szerint. A proteomikában csaknem kizárólag olyan kromatográfiás rendszereket használunk, melynek állófázisa szilárd halmazállapotú anyag (töltet), melyet egy csatlakozókkal ellátott csőbe (oszlop, kolonna) töltenek. Az oszlopra felvitt mintakomponenseket a folyadék fázisú mozgófázis

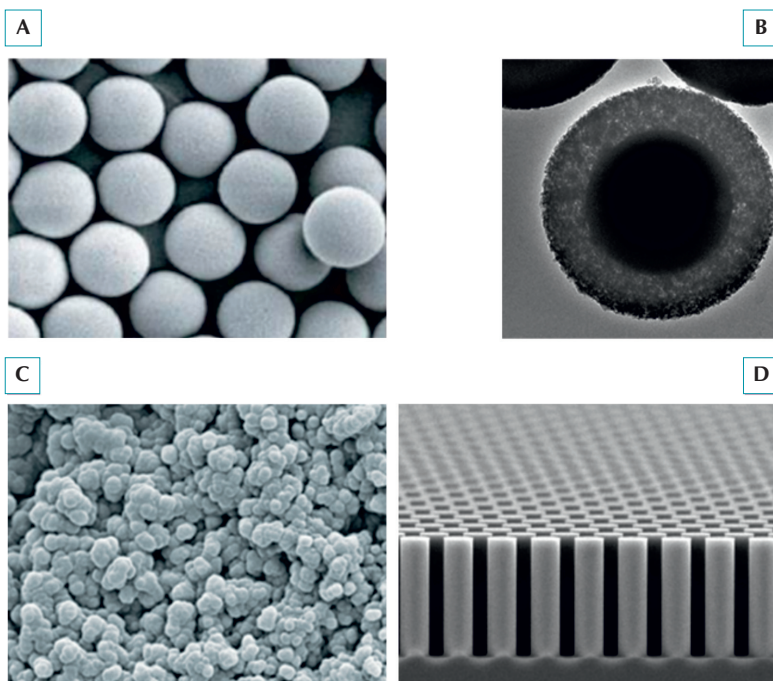


4.4. ábra. Kromatográfias csúcsok jellemző adatai

(eluens, oldószerkeverék) áramoltatásával egymástól részben/teljesen elválva oldjuk le, eluáljuk az állófázisról. A többi kromatográfias módszerrel szemben a folyadékkromatográfia előnye, hogy a mozgó- és állófázisok, valamint az elválasztási mechanizmusok nagy választéka és sokoldalú kombinálhatósága legkülönbözőbb minták analízisét, komponenseinek preparatív tisztítását teszik lehetővé. Tekintettel arra, hogy a proteomikai vizsgálatok során csak peptidokkal, fehérjékkel és azok módosított formáival foglalkozunk, a kromatográfias elválasztásokról szóló ismereteket is csak erre a területre szűkítve tárgyaljuk.

### Folyadékkromatográfias állófázisok

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiában a komponensek elválasztását elsődlegesen az állófázis minősége határozza meg. Minden állófázissal szemben követelmény, hogy nagy fizikai és hőstabilitással rendelkezzen, kémiaiag inert legyen, ne lépjen reakcióba a minta komponenseivel, oldhatatlan legyen bármely mozgófázisban és az elválasztás érdekében megfelelő kölcsönhatásba tudjon lépni a minta komponenseivel. Az elválasztások hatásfokának növelése érdekében az állófázisok fejlesztése során arra törekedtek, hogy a kromatográfias oszlopban egyforma geometriájú terek jöjjenek létre, hogy egy adott komponens anyagátadási folyamatai (anyagátadás, diffúzió) minél egységesebbek legyenek. Az állófázisok jelentős része szintetikus, porózus szemcsékből áll. A fejlesztések eredményeképpen sikerült olyan kis méretű (1,6–5  $\mu\text{m}$ ) gömbszimmetrikus, homodiszperz szemcseméret-eloszlású részecskéket előállítani (4.5. ábra, A), melyek eleget tettek a fenti kívánalmaknak, és használatukkal nagyon hatékony elválasztások érhetők el. Az állófázisok minőségét további tulajdonságok, mint a pórusméret, pórusméret-eloszlás, porozitás, kölcsönhatásban részt vevő fajlagos felület nagysága és a felületen lévő funkciók csoportok (a felület kémiaja) is jelentős mértékben befolyásolják. A szemcseméret csökkenésével növekszik az elméleti tányérszám (ezáltal az elválasztás hatékonysága), azonban a kisebb részecskék nagyobb ellenállást váltanak ki a mozgófázis áramlásával szemben, így a nyomásesés (a kromatográfias oszlop eleje és vége közötti nyomáskülönbség) nagyobb lesz az oszlopon. Ezért a kisebb szemcseméretű oszlopok használatakor nagyobb nyomás szükséges a mozgófázis áramoltatásához.



**4.5. ábra.** Folyadékkromatográfiás állófázisok szerkezete.

**A:** porózus részecskék, **B:** héjszerkezetű részecskék, **C:** monolit, **D:** „mikropillér sor”

Ugrásszerűen terjedtek el a 2,5–3,5  $\mu\text{m}$  átmérőjű héjszerkezetű (törmőmagvú, vagy mag-héj szerkezet) állófázisok (4.5. ábra, B), melyek sikerüket annak köszönheték, hogy optimalizált HPLC készülékekkel is hasonló hatékonyságú elválasztások lettek elérhetők, mint az UHPLC készülékekkel. Előnyös tulajdonságaikat a vékony porózus réteg miatti gyorsabb anyagátadásnak és a kedvezőbb hosszirányú diffúciónak köszönhetik.

Két-három évtizedes múltra tekint vissza a monolit töltetek fejlesztése. A monolit szerkezetű állófázis szerves, szilika vagy szerves szilícium alapanyagokból tömbpolimerizációval az oszlopban előállított, makro- és mezopózusos „rúd” (4.5. ábra, C). Legfőbb előnyük, hogy szerkezetükből adódóan kis áramlási ellenállással rendelkeznek, így nagy áramlási sebességgel kis nyomásesés mellett gyors elválasztásokat lehet elérni.

A legújabb, proteomikában is használt kromatográfiás állófázis a kvarc-chip-en litográfiai módszerrel előállított „mikropillér sor” ( $\mu$ -pillar array) (4.5. ábra, D). A mikropillérek tökéletesen rendezett elhelyezésével és a méretek szigorú ellenőrzésével sokkal homogénebb áramlási utak érhetők el az oszlopon belül, ami növeli az elválasztás hatékonyságát (növeli az elméleti tányérszámot, minimalizálja a csúcsszéledést és növeli a csúcskoncentrációt és csúskapacitást). A szabadon álló mikropillérek sokkal kisebb áramlási ellenállást fejtenek ki, ami hosszú oszlopok használatát is lehetővé teszi. Szemben a töltött oszlopok szemcséinek véletlenszerű, nem reprodukálható elrendezésével szemben, a mikropillér sor chipen az előállítás technológiájából következőleg mindig ugyanolyan szerkezetűek, ami rendkívüli mértékben javítja a mérések reprodukálhatóságát.

### Folyadékkromatográfiás mozgófázisok

A kromatográfiás elválasztások alapvető eleme a minta, az állófázis és a mozgófázis között kialakuló kölcsönhatások sokszínűsége. Így érthető, hogy a mozgófázis tulajdonságai jelentősen befolyásolják az elválasztások eredményét. A folyadék halmazállapotú mozgófázis

minőségének és összetételének tág határok közötti változtathatósága lehetőséget teremtett a minta molekuláris paramétereinek (molekulatömeg, alak, polaritás, ionos tulajdonságok, hidrofobicitás, komplexképzés) hatékony kihasználására, ami nagyban hozzájárult a különböző folyadékkromatográfiás módszerek kifejlesztéséhez és széleskörű alkalmazásához.

A peptidek és fehérjék többsége vízoldható vegyület, ezért kézenfekvő, hogy folyadékkromatográfiás vizsgálatukban a mozgófázis fő komponense a víz. Sók, savak, bázisok, szerves oldószerek és egyéb adalékanyagok hozzáadásával készített vizes oldatok összetétele, ionerőssége, kémhatása, polaritása, szervesoldószer-tartalma mind befolyásol(hat)ják a minta komponenseinek álló- és mozgófázisok közötti megoszlását. Gyakori, hogy mozgófázissal történő érintkezés hatására a mintakomponensek tulajdonságai (pl. oldékonyság, ionizáltsági állapot, másodlagos intermolekuláris kölcsönhatások, mint a H-kötés mértéke) megváltoznak, és a kromatográfiás vizsgálat folyamata alatt is módosulnak. Ezért a mozgófázis tulajdonságait úgy kell megválasztani és optimalizálni, hogy egy adott típusú elválasztásban minél jobban ki lehessen használni a fenti paraméterek hatásait.

A mozgófázis viszkozitása befolyásolja a kromatográfiás oszlopon bekövetkező nyomásesést. A folyadékfázis viszkozitásának növekedése együtt jár az áramlási ellenállás emelkedésével, tehát nagyobb nyomással lehet a mozgófázist az oszlopon keresztüláramoltatni. Más szempontból is célszerű a viszkozitás minél alacsonyabban tartása, mert az eluens viszkozitásának csökkentése növeli az álló és mozgófázis közötti anyagátadás sebességét, ami keskenyebb kromatográfiás csúcsokat eredményez. A hőmérséklet növelése csökkenti az eluens viszkozitását, ezért pl. a bottom-up proteomikai vizsgálatokban a kromatográfiás elválasztásokat 40–60 °C-on végzik.

**A kromatográfiás a mozgófázissal szemben támasztott általános követelmények** a következők:

- megfelelően oldja a minta komponenseit,
- megfelelő retenciót biztosítson lehetőleg minden mintakomponensnek az adott állófázison,
- kompatibilitás más oldószerekkel (grádiens elúció során ne legyen szételegyedés, sókiválás),
- ne legyen toxikus,
- ne zavarja a minta komponenseinek detektálhatóságát (UV-detektor esetén alacsony „cut-off” értéke legyen, tömegspektrometriás detektálás esetén minden alkotója illékony legyen, és ne okozzon ionsuppressziót),
- minden komponense nagy tisztaságú, lehetőleg MS-minőségű legyen, azaz egy határérték alatt tartalmaz MS-detektálást zavaró szennyezéseket,
- ne tartalmazzon mechanikai szennyezőket.

### A folyadékkromatográfiás elúció típusai

A 4.3. és 4.4. **A ábrán** egy kétkomponensű elegy elválasztása, illetve kromatogramja látható állandó összetételű mozgófázis esetén. Ezt az ún. *izokratikus elúciót* (a kromatográfiás futtatás során a mozgófázis összetétele és áramlási sebessége állandó) akkor alkalmazzuk, amikor a mintában lévő komponensek retenciók tényezője egy adott rendszerben  $1 \leq k \leq 10$  tartományba esik. A nagyobb retenciójú (nagyobb megoszlási hányadosú) komponensek hosszabb időt töltenek el az állófázisban, ezért később és a diffúzió miatt egyre szélesebb (és a csúcs alatti terület változatlansága miatt laposabb) csúcsok formájában formájában hagyják el az állófázist, sőt egy adott erősségű eluens mellett lehetnek olyan komponensek, amelyek az állófázison maradnak. Az eluens erősségének növelésével ugyan csökkenthető az analízis időtartama, azonban a kevésbé visszatartott komponensek között romlik a felbontás, sőt koelúció is létrejöhet. Így ez az elúciós mód jellemzően nem alkalmas peptidek és fehérjék

elválasztására, mert a proteomikai minták rendkívül összetettek, az egyes komponensek nagyon változatos fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, ezért kromatográfiás tulajdonságaik is széles tartományban változnak. Peptid- és fehérjekeverékek elválasztása leggyakrabban *grádiens elúcióval* történik, amikor a kromatográfiás futtatás alatt a mozgófázis elúciós erősségét valamelyik összetevője (só, szerves oldószer) koncentrációjának vagy az eluens pH-jának változtatásával folyamatosan növeljük. Így elérhető, hogy a kromatogram elején a kevésbé visszatartott komponensek is jól elváljanak és az állófázishoz erősebben kötődő komponensek gyorsabban eluálódnak. Óriási előnye a grádiens elúciónak, hogy a komponensek közel azonos szélességű, keskeny csúcsok formájában eluálódnak. Ez egyrészt elősegíti az jobban kötődő komponensek detektálását, másrészt a jel/zaj viszony növekedésével –a csúcs alatti terület állandósága miatt– csökkenti a kimutatási határt, valamint növeli a csúcskapacitást. Mindez az ún. csúcskompresszió jelenségével magyarázható. Grádiens elúció alkalmazásakor az állófázison negatív profil alakul ki, azaz az oszlop elején erősebb eluens lép be, mint ami elhagyja az oszlopot. Ez azt is jelenti, hogy a komponensek elúciós sávjainak elején kisebb, míg a végén nagyobb a mozgó fázis elúciós erőssége. Ennek következtében a sáv eleje lassabban, vége pedig gyorsabban vándorol, azaz a sáv összenyomódik, a csúcs keskenyebb lesz.

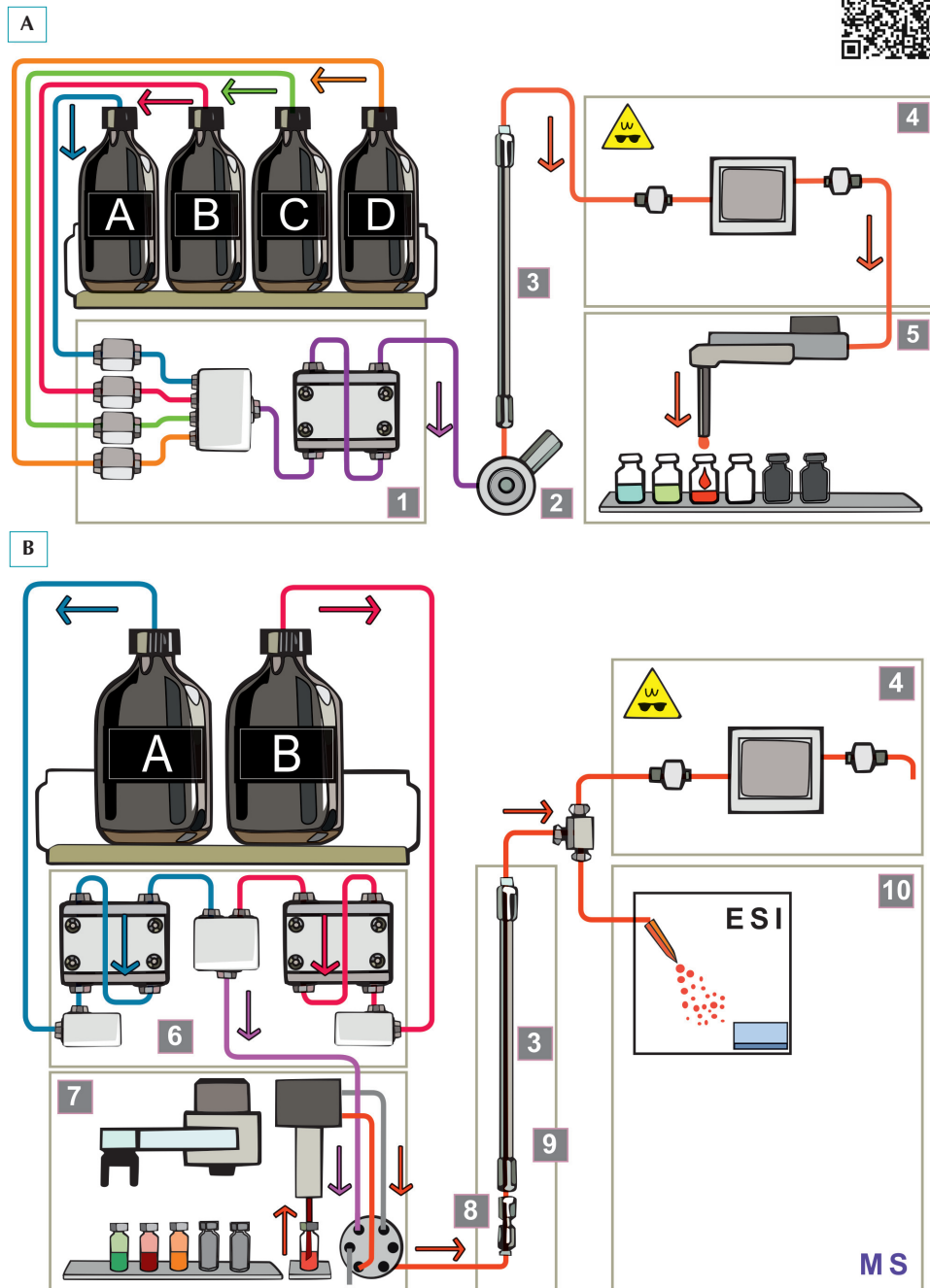
A grádiens elúciónál alkalmazott eluensek kezdeti és végső erőssége, a grádiens alakja (lineáris, konvex, konkáv, lépcsős, kombinált), időtartama és meredeksége mind befolyásolja a kromatográfiás elválasztást. A bottom-up proteomikában leggyakrabban használt fordított fázisú folyadékkromatográfiában lineáris grádiens alkalmazunk, ahol az elúció erőssége az oldószerek apolaritásával növekszik (víz < metanol < acetonitril < etanol < 2-propanol < tetrahidrofurán).

### A folyadékkromatográfiás rendszer felépítése

A folyadékkromatográfiás elválasztás céljainak, az elérni kívánt hatékonyságnak, felbontásnak és szelektivitásnak megfelelően más és más típusú kromatográfiás rendszereket használhatunk. Minden folyadékfázisú oszlopkromatográfiás rendszer leglényegesebb elemei az állófázissal megtöltött cső/oszlop (üveg, műanyag, fém), amelyen a mozgófázis egy folyadékpumpa (szivattyú) által létrehozott nyomás hatására áthalad. A mintát egy szelepen (injektor) keresztül juttatjuk az áramló mozgófázisba, ami az állófázison elváló mintakomponenseket a detektorba juttatja. A rendszer szükség szerint kiegészíthető az eluensek gáztartalmát csökkentő gázmentesítő egységgel, második folyadékpumpával, a védőoszloppal, keverőszelepekkel, automata mintaadagolóval, termosztáttal, frakciószedővel, második detektorral, valamint adatgyűjtő és vezérlőegységekkel (4.6. ábra). A számítógép-vezérelt folyadékkromatográfiás rendszer lehetővé teszi a minta bejuttatásának, elválasztásának, detektálásának és a kromatogram kiértékelésének teljes automatizálását.

A „klasszikus” fehérjekromatográfiás elválasztások során az oszlopban (üveg) lévő lágy gyantaszemcséken, illetve gél állapotú tölteteken a mozgófázis átáramoltatása hidrosztatikus nyomással vagy perisztaltikus pumpákkal (1–5 MPa) történik. Ezek a módszerek korlátozott elválasztóképességgel rendelkeznek. Az elválasztások javítása érdekében fejlesztették ki a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) rendszereket, amelyek analitikai elválasztásokhoz 3–10 µm szemcseméretű szilárd, rigid, stabil szerkezetű állófázisokat tartalmazó fémoszlopokat és az eluensek áramoltatásához szükséges nagy nyomású (5–40 MPa) folyadékpumpákkal működnek. Mindegyik „klasszikus” fehérjekromatográfiás rendszernek kifejlesztették a megfelelő nagyhatékonyságú változatát, így alkalmassá váltak (más anyagok mellett) peptidek elválasztására is. A folyadékkromatográfiás elválasztások felbontása növel-





**4.6. ábra.** Egyszerű (A) és összetett (B) folyadékkromatográfiás rendszer felépítése.

1. kvaterner pumpa, 2. manuális injektor, 3. kromatográfiás oszlop, 4. UV detektor, 5. frakciószedő, 6. biner pumpa, 7. automata mintaadagoló, 8. védőoszlop, 9. oszloptermosztát, 10. tömegspektrométer elektropray ionforrással. A B rendszerben az egyik detektor opcionális.

hető az állófázis szemcseméretének csökkentésével. A 2  $\mu\text{m}$  alatti, ún. „sub-2  $\mu\text{m}$ ” átmérőjű töltetek alkalmazásához nagyobb nyomásokat (40–140 MPa) biztosító folyadékpumpát, a nyomást álló mintabeviteli egységet, szelepeket, csatlakozókat tartalmazó folyadékkromatográfiás rendszerre (UPLC/UHPLC) van szükség. A monolit és mikropillérsor oszlopok alacsonyabb nyomás mellett biztosítanak hatékony elválasztást.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiában használt pumpáknak a következő alapvető kritériumokat kell teljesíteniük: az eluenst nagy nyomáson, változtatható, de állandó térfogati sebesség mellett pulzálásmentesen kell szállítaniuk. A különböző gyártmányú készülékek ezt eltérő megoldásokkal érik el, azonban általános, hogy egy-egy pumpafejben két, alternáló mozgást végző, pozitív térkiszorítású, kis térfogatú dugattyú mozgatja az eluenst. A pumpák eluenssel érintkező belső felületének ellenállónak kell lennie korrozív oldatokkal (sóoldatok, haloidionok, salétomsav stb.) szemben. A gyors eluenscsere érdekében öblítőszeleppel (priming/purging valve), automatikus kompresszibilitás-kompenzációval kell rendelkezniük, hogy változó eluens-összetétel ellenére a ténylegesen szállított térfogat állandó legyen. Az újabb kromatográfiás pumpák beépített vákuumkamrás gázmentesítő egységet tartalmaznak, ami eltávolítja az eluensekben oldott oxigént, csökkentve a pumpafejben vagy a detektor cellában problémát okozó buborékképződés esélyét.

A peptidek/fehérjék nagyhatékonyságú elválasztására csaknem kizárólag grádiens elúciót használunk. Az eluensek keverési arányát az egyik megoldás szerint a kisnyomású oldalon lévő, számítógép-vezérelt szeleprendszer állítja be, majd az elegyet a nagynyomású pumpa juttatja be mintaadagoló egységen keresztül az oszlopra (kvaterner pumpa) (4.6. **ábra, A**). A másik megoldásban az eluenseket két (egybeépített) nagynyomású pumpa meghatározott profil szerint a megkívánt összetételűre keveri (biner pumpa) (4.6. **B ábra**). A nano-, kapilláris és szűkfuratú (microbore) oszlopon történő kromatográfiához inkább a második megoldást alkalmazzuk, mert az ilyen rendszerekben a kisebb belső térfogat (dwell-volume) miatt kisebb a grádiens késleltetése.

A minta folyadékáramba történő bejuttatása a mintaadagolóval (injektor) történik, melynek feladata, hogy a minta pillanatszerűen, reprodukálható módon, veszteség nélkül, az eluensek áramlásának leállítása nélkül kerüljön az oszlopra. Megfelelő minőségű elválasztásokhoz az oszlop térfogatának 1–3%-ban célszerű a mintát bejuttatni. Egyszerűbb esetben a manuális injektor hurokjába fecskendővel töltjük be a kívánt mennyiségű mintát és az injektorszelep elfordításával történik annak injektálása (4.6. **ábra, A**). Nagyszámú minta analízisekor vezérelhető automata mintaváltóval felszerelt átfolyótűs injektort használunk (4.6. **ábra, B**). Ezek mintatartója hűthető, lehetővé téve az esetleg hőre érzékeny minták vizsgálat alatti tárolását.

A nagyhatékonyságú kromatográfiás oszlopok nyomásnak ellenálló, sima belső felületű, csatlakozóval és szűrővel ellátott, inert anyagból, így kvarcból, műanyagból (PEEK), leggyakrabban rozsdamentes acélból készült csövek. Amennyiben meg akarjuk őrizni a peptidek, fehérjék biológiai aktivitását, illetve minél kisebb veszteséggel akarjuk ezek elválasztását elérni, speciális anyagú, ún. biokompatibilis oszlopokat célszerű használni. A kromatográfia céljától, valamint a minta mennyiségétől függően különböző átmérőjű, hosszúságú, állófázisú oszlopokat használhatunk. Az oszlopok átmérő szerinti osztályozása, a hozzájuk tartozó tipikus áramlási sebességek, a célszerűen injektálható mintamennyiségek, a 4,6 mm-es oszlophoz viszonyított csúcskoncentrációk és a 75  $\mu\text{m}$  kapillárisához viszonyított terhelhetőségek a 4.1. **táblázatban** találhatók.

A kromatográfiás elválasztások reprodukálhatósága érdekében szükséges az oszlopok termosztálása. Ezzel egyrészt kiküszöbölhető a környezeti hőmérséklet-ingadozások zavaró



4.1. táblázat. Kromatográfiás oszlopok jellemző adatai

Elnevezés	Tipikus átmérő (mm)	Tipikus áramlási sebesség (μl/perc)	Oszlop-térfogat (μl)	Minta-térfogat (μl)	Relatív koncentráció	Relatív terhelési kapacitás
Analitikai LC	4,6	1300	2492*	25	1	3762
„Micro-bore” LC	2,1	270	519	5	5	784
Mikro-LC	1	60	118	1	21	178
Kapilláris LC	300 μm	5	10,6	0,1	235	16
Nano-LC	75 μm	0,35	0,66	0,007	3762	1

\*150 mm oszlophosszal számolva

hatása, másrészt csökkenthető a HPLC oszlopokban törvényszerűen kialakuló hossz- és keresztirányú hőmérséklet-grádiensek csúcscsúszó hatása. A hőmérséklet növelésével csökken az eluensek viszkozitása, ami csökkenti az oszlopon a nyomásesést, viszont nő az anyagátadás sebessége, ami gyorsítja az elválasztást.

Folyadékkromatográfiás vizsgálatok során a mintakomponensek valamilyen speciális fizikai, kémiai vagy biológiai tulajdonságának követésével megvalósítható a komponensek detektálása, elúciós paramétereik meghatározása, mennyiségi és minőségi jellemzésük. A detektorokkal szemben támasztott alapvető követelmény, hogy működési elvük és szerkezetük a lehető legnagyobb mértékben kompatibilis legyen az kromatográfiás módszer mechanizmusával és körülményeivel. Olyan detektort kell választani, amely az adott komponensre nézve több nagyságrend dinamikus tartománnyal, széles lineáris tartománnyal, nagy érzékenységgel, alacsony zajjal stb. rendelkezik. A proteomika minta-előkészítési lépéseiben, fehérjék elválasztásának követésére alkalmasak lehetnek az ultraibolya spektrofotometriás detektorok, melyek megfelelnek a fenti követelményeknek. A peptidekben/fehérjékben lévő kromofór csoportok (peptidkötés: 190 nm és 210–220 nm, aromás aminosavak: 254, 278 nm) fényelnyelése lehetővé teszi érzékeny detektálásukat. Azonban a biológiai mintákban jelen lévő fehérjék, illetve a belőlük emésztéssel nyert peptidek óriási száma miatt a kromatográfia során az egyes komponensek nem elkülönült csúcsok formájában, hanem több komponens együtt eluálódva hagyja el az oszlopot. Ezért olyan detektorra van szükség, amely a koeluálódó komponensek minél nagyobb hányadáról tud kvalitatív és kvantitatív információt adni. Az atmoszférius ionizációt alkalmazó elektropray ionforrások megjelenésével lehetővé vált peptidek/fehérjék tömegspektrometriás detektálása és mérése, ami megadta az alapot az MS-alapú proteomika kialakulásának (lásd 2. fejezet).

### Folyadékkromatográfia nano- és kapilláris oszlopokon

A rendszerbiológia kialakulásával és fejlődésével folyamatos elvárás mutatkozott az LC-MS alapú proteomikai vizsgálatokból nyerhető információk mennyiségének/mélységének növelésére és áteresztőképességük javítására. A nagyobb érzékenység, szelektivitás és gyorsabb ciklusidő iránti igény a tömegspektrometriás és folyadékkromatográfiás műszer- és oszloptechnológia rendkívüli fejlődéséhez vezetett.

Ismeretes, hogy a kromatográfiás elválasztás során a minta folyamatosan hígul a beadástól a detektorig, és hogy a csúcskoncentráció fordítva arányos az oszlop sugarának négy-

zetével. Ebből következik, hogy az oszlop átmérőjének csökkentésével csökken a minta hígulása, azaz nő a csúcskoncentrációja. Amint az a **4.1. táblázat** adataiból látható, az oszlop átmérőjének 4,6 mm-ről 75  $\mu\text{m}$  csökkentése az érzékenység 3700-szoros (a gyakorlatban azért ennél kisebb) növekedését eredményezi. Az oszlop átmérőjének kapilláris- és nano-LC tartományra való csökkentése maga után vonja a térfogatáram csökkenését (egyforma lineáris sebesség fentartása esetén) mikroliter-nanoliter/perc szintre, ami javítja az elektropray-ionizáció hatásfokát, így növeli az MS detektálás érzékenységét. A kisebb átmérőjű oszlopok további előnye az elúcióhoz szükséges minimális oldószer- és adalékanyag-igény, valamint ezen oszlopok gyors és hatékony hőátadásának köszönhetően az elválasztási hőmérséklet könnyű szabályozhatósága. Ugyanakkor a nano-LC-MS rendszerekkel nagyon kis mennyiségben rendelkezésre álló biológiai minták vizsgálata is lehetővé vált.

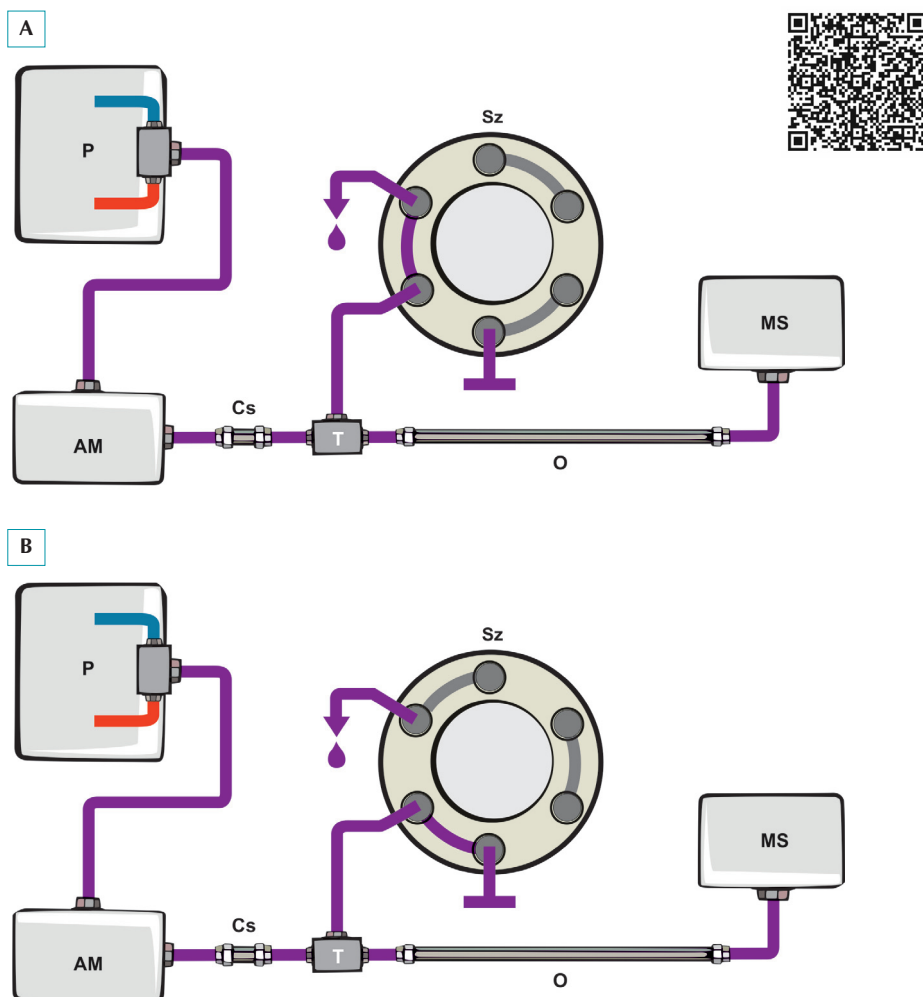
A másik kulcsparaméter, ami a nano-LC-t a bottom-up proteomika nélkülözhetetlen eszközévé tette az a töltetrézecskek átmérőjének fokozatos csökkentése (1,5–3  $\mu\text{m}$ ), ami rendkívül jó elválasztási hatékonyságot eredményezett nano-LC oszlopokban is. A szemcse-méret-csökkenés velejárója az oszlopon bekövetkező nyomásesés növekedése, ezért a nano-LC oszlopokat leggyakrabban nano-UHPLC rendszerekben alkalmazzuk. A kromatográfiás csúcsok kiszélesedése (variancia) egyrészt az oszlopban lejátszódó folyamatok, másrészt az oszlopon kívüli hatások eredménye. Az oszlopon elért elválasztás az oszlopon kívüli üres térfogatok miatt gyorsan romolhat. Gyakorlati szempontból ez azt jelenti, hogy az összes átfolyási teret (injektor, kapilláris csatlakozások, detektorcellák térfogata) minimalizálni, míg az adatgyűjtési sebességet maximalizálni kell. Az egyes egységeket összekötő kapillárisokat a lehető legrövidebbre kell venni, és olyan kis belső átmérőjűt kell választani (25–40  $\mu\text{m}$ ), ami még elfogadható ellennyomás-növekedést eredményez, illetve nem könnyen dugul el. Anyaguk speciális rozsdamentes acél, ömlesztett szilika (kvarc) és PEEKsil (PEEK műanyaggal bevont kvarc). Már kaphatók olyan csatlakozók (fitting, union), melyek holttermentes zárást biztosítanak akár 1300 bar nyomáson is.

A kereskedelemben különböző belső átmérőjű, hosszúságú, állófázisú (pórusos, héjszerkezetű) és típusú töltött nano- és kapilláris kromatográfiás oszlop kapható, azonban ezek kellő gyakorlattal házilag is elkészíthetők. A proteomikai analízishez a 150–250 mm hosszúságú, 75  $\mu\text{m}$  belső átmérőjű nano-LC oszlopok terjedtek el. Ez az oszlopformátum jó kompromisszum az érzékenység, a terhelhetőség és a robusztusság között. A nano-LC oszlopok anyaga ömlesztett kvarc vagy PEEKsil, míg kapilláris oszlopok többnyire rozsdamentes acélból készülnek. Az állófázis visszatartása céljából különböző megoldásokat (frit, szitaszövet stb.) alkalmaznak, azonban nincs optimális megoldás, mindegyik negatívan befolyásolja a csúcsok kiszélesedését. A töltött oszlopok alternatívái a monolitikus oszlopok. Ezeknél az oszlopban egybefüggő porózus szerkezetet alakítanak ki (szilícium-dioxid vagy polimer), így nincs szükség frit-re, mivel az állófázis az oszlop falához van rögzítve. A szintetizált oszlopok kiváló hatékonyságot, stabilitást és specifikus szelektivitást biztosítanak; előállítá-suk azonban meglehetősen nehézkes és időigényes.

A nano-LC oszlopok általában 500 nl/perc alatti áramlási sebességet igényelnek. A reprodukálható áramlási sebesség és grádiensképzés eléréséhez speciális folyadékszállítási megoldásokat dolgoztak ki, amelyek három kategóriába sorolhatók: passzív osztás (passive split), aktív osztás (active split) és osztás nélküli (splitless) rendszerek. Az első két megoldás legnagyobb hátrányát (a folyadékáram megosztása miatt az eluensek túlnyomó része kárba vész) az osztás nélküli rendszerek kiküszöbölték. Ez utóbbi egyik verziója a fecskendőpumpákat alkalmazó „eluens újratöltés” folyadékszállító egység, a másik fajtája a „klasszikus”,

csatornánként két ellentétes mozgást végző dugattyús rendszer, amiben a dugattyúk mozgását rendkívül precízen vezérlik.

A helyes mintainjektálási eljárás minden kromatográfiás módszer esetében alapvető fontosságú. Különösen igaz ez a nano-LC-re, ahol az oszlopok átmérője és teljes térfogata viszonylag kicsi (4.1. táblázat), így a célszerűen beadható minta térfogata is csak néhány nanoliter. A minták koncentrációja általában nem elegendően nagy, hogy ilyen térfogatban jól detektálható mennyiséget lehessen bejuttatni a nano-LC oszlopra. Ezért a mindennapi gyakorlatban direkt injektálást on-line fókuszálással (1–5  $\mu\text{l}$  minta) off-line vagy on-line előkoncentrált szokás alkalmazni. Az oszlopon történő fókuszálás során a mintát az induló kromatográfiás eluensnél kisebb elúciós képességgel rendelkező eluensben feloldva injektáljuk. Ekkor az oszlop tetején keskeny mintadugó képződik, még akkor is, ha viszonylag nagy mennyiséget (1–5  $\mu\text{l}$ ) injektálunk. A minta off-line előkoncentrálása térfogatának csökkenté-



4.7. ábra. Peptidok csapdaoszlopon történő dúsítása (A) és LC-MS analízise (B).

P: biner pumpa, Am: automata mintaadagoló, Cs: csapdaoszlop, Sz: váltószelep, O: kapilláris vagy nano-LC oszlop, MS: tömegspektrométer elektropray ionforrással

sével (oldószer elpárologtatása, liofilizálás) egyszerűen megoldható, valamint miniatűr szilárd fázisú extrakcióval (SPE) (pipettahegybe integrált fordított fázisú töltet) sómentesítése is elvégezhető. Az on-line előkoncentráció egy változata látható a **4.7. ábrán**, melynek során viszonylag nagy térfogatú (akár 50 µl) mintát injektálunk a rendszerbe épített csapdaoszlopra (pl. 20 mm x 180 µm, C18) az elválasztási áramláshoz képest nagyobb áramlási sebességgel (pl. 10 µl/perc). A csapdaoszlop megköti a vizsgálni kívánt komponenseket, de nem akadályozza a sók és más hidrophil vegyületek kimosását, valamint hatékonyan védi az elválasztó oszlopot az eltömődés ellen (**4.7. ábra, A**). A szelep átfordítása után normál sebességgel (pl. 350 nl/perc) végezzük a kromatográfiát a nano-LC oszlopon (**4.7. ábra, B**) (pl. 250 mm x 75 µm, C18).

A **mikrofluidikai technológiával készült chip** megjelenése a folyadékkromatográfiában új lehetőségeket nyitott meg kis mennyiségű minták analízisére. A chip az integráció és miniatürizálás magas fokát képviseli. A technológia lehetővé teszi egy mintahurok, egy dúsító oszlop, egy elválasztó oszlop, egy MS ionizációhoz szükséges nanospray-emitter egyetlen kompakt platformba történő integrálását szerelvények, kötések vagy egyéb elemek nélkül. Bevezetésük célja az LC-MS analízisek megbízhatóságának, reprodukálhatóságának javítása, az áteresztőképesség fokozása, a költségek csökkentése és a kromatográfiás lépések egyszerűsítése, hogy a kevésbé gyakorlott felhasználók is könnyen tudják alkalmazni. A célok maradéktalan megvalósításához további fejlesztések szükségesek.

### Peptidok és fehérjék folyadékkromatográfiás vizsgálatának lehetőségei a kölcsönhatás típusa szerint

Az aminosavakból felépülő peptidok, fehérjék (biopolimerek, makromolekulák) egyrészt az egyes aminosavak oldalláncainak különböző tulajdonságai miatt, másrészt a polipeptidlánc hosszának és szerkezetének (aminosavsorrend, másodlagos, harmadlagos szerkezeti elemek) egyedisége miatt különböző nagyságúak, alakúak, töltésűek, polaritásúak és hidrofobicitásúak lehetnek. Ennek következtében a peptidok, fehérjék sokféle kémiai állófázissal tudnak kölcsönhatást kialakítani, így többfajta, egymással ortogonális kromatográfiás rendszerben is vizsgálhatók.

A peptidok/fehérjék fenti tulajdonságai jelentősen befolyásolják az állófázissal kialakított kölcsönhatásaikat, így folyadékkromatográfiás tulajdonságaik nagymértékben eltérnek a kismolekulájú vegyületek kromatográfiás tulajdonságaitól. A makromolekulák alakja, hidrodinamikai átmérője lényegesen nagyobb, mint a kismolekuláké, sőt a mozgófázis sőtartalmától, ionerősségétől, pH-jától, szervesoldószer-tartalmától függően változhat. A fehérjék nagyobb átmérőjük következtében akkor tudnak kölcsönhatásba lépni a kromatográfiás töltettel, ha megfelelően hozzáférnek a pórusok belső felületéhez. Elegendően nagy pórusátmérőjű (300–1000 Å) töltetek esetében a makromolekulák be tudnak lépni a pórusokba, ill. a már megkötődött molekulák nem gátolják továbbiak belépését. Peptidok nagyhatékonyságú kromatográfiájához 100–150 Å pórusátmérőjű töltetek javasoltak. A molekulák diffúziós együtthatója csökken méretük növekedésével (és függ az alakjuktól is), így az anyagátadás sebessége is kisebb lesz, ami magyarázza a fehérjék szélesebb folyadékkromatográfiás csúcsait. A héjszerű töltetek kisebb diffúziós úthosszuk miatt jól alkalmazhatók fehérjék analízisére.

**Méretkizárásos kromatográfia (SEC) (géliszűrés):**

*elválasztás alapja:* a minta komponenseinek hidrodinamikai mérete, illetve alakja

*állófázis:* nagyon porózus töltet kontrollált méretű pórusokkal; szférikus szilikagél részecskék (felületi módosításokkal vagy anélkül), vagy keresztkötött polimer gél (hidrofób, hidrofil, ionos)

*mozgófázis:* vizes oldatok, pufferek

*folyamat:* az állófázis változtatott méretű pórusaiba csak azok a mintakomponensek tudnak belépni, melyek hidrodinamikai átmérője kisebb az adott pórus átmérőjénél és ott hosszabb-rövidebb ideig tartózkodnak. Minél nagyobb a molekula mérete, annál kevesebb pórusba fog beleférni, azaz annál gyorsabban vádrol, így méretük csökkenő sorrendjében eluálódnak

**Ioncserés kromatográfia (IEC):**

*elválasztás alapja:* ionos kölcsönhatások

*állófázis:* porózus vagy nemporózus szilikagél, szerves polimer (polisztirol-divinilbenzol, polimetakrilát) szemcsék, melyek felületére pozitív vagy negatív töltésű funkciócsoportok vannak kötve

*kationcserélők:* negatívan ionizálódó szulfo- vagy karboxilcsoportot tartamaznak, melyek a pozitív ionokat (minta, illetve ellenionok) erősen vagy gyengébben megkötik (SCX, WCX)

*anioncserélők:* pozitív kvaterner amino- vagy pozitívan ionizálódó szekunder, terciér aminocsoportot tartalmaznak, melyek a negatív ionokat (minta, illetve ellenionok) erősen vagy gyengébben megkötik (SAX, WAX)

*mozgófázis:* alkalmas mennyiségű és minőségű só (ellenionok) tartalmazó vizes oldatok, melyek pH-ja pufferek, polaritása szerves oldószerek hozzáadásával változtatható

*folyamat:* a szerkezetüktől és a mozgófázis pH-jától függően ionizált mintakomponensek különböző erősségű elektrosztatikus kölcsönhatást alakítanak ki az ellenkező töltésű állófázissal, melyről só- vagy pH-grádiens alkalmazásával kötése erősségük függvényében eluálhatnak

**Affinitáskromatográfia (AC):**

*elválasztás alapja:* rendkívül (bio)specifikus kölcsönhatás peptid/fehérjék és az állófázishoz rögzített kötőcsoport (ligandum) között

*állófázis:* agaróz, cellulóz gélekhez, szerves polimerekhez, szilikagélhez (szemcsék vagy monolit) kötött, az elválasztani kívánt molekulával specifikus kötést kialakítani tudó, ún. affinitás ligandum

*mozgófázis:* a peptid/fehérjék megkötését biztosító megfelelő pH-jú, koncentrációjú, polaritású pufferoldat; a peptid/fehérjék eluálását biztosító pH-jú, koncentrációjú, polaritású adalékolt pufferoldat

*folyamat:* a minta komponensei specifikus kölcsönhatásokkal (antitest–antigén, glikoprotein–lektin, immunglobulin–protein A, hisztin–nukleinsav, biotin–avidin stb.) megkötődnek az állófázis felszínén, melyről a nem-kötődő komponensek lemosása után a peptid/fehérjék a specifikus kötést megszüntető, esetleg a makromolekuláknál erősebben kötődő vegyületet tartalmazó oldattal eluálhatnak

**Rögzített fém-kelát affinitási kromatográfia (IMAC):**

*elválasztás alapja:* kelátkomplex-képzés

*állófázis:* agaróz, dextrán, szilikagél, mágneses gyöngy felszínén kémiai kötött komplexképző csoportokkal

*mozgófázis:* megfelelő koncentrációjú, kémhatású pufferoldat komplexképző fémionokkal ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{4+}$  stb.) a kelátkomplex kialakításához, majd megfelelő koncentrációjú, kémhatású pufferoldat (esetleg kompetitíven kötődő az anyaggal) a kelátkomplex megszüntetésére

*folyamat:* a rögzített komplexképző csoport a fémionnal komplexet, majd a hozzáadott peptid/fehérje bizonyos csoportjával (hisztidin, glikán, foszfát stb.) kelátkomplexet képez. A nem kötődött komponensek lemoshatók, majd a kelátkomplexet megszüntető oldattal a peptid/fehérjék eluálhatnak

**Hidrofób kölcsönhatású kromatográfia (HIC):**

*elválasztás alapja:* fehérjék hidrofób kölcsönhatása a hidrofób állófázissal

*állófázis:* poliszacharid gélek, porózus vagy nem-porózus, kötött rövid szénláncú ( $n = 4-8$ ) alkil-, fenil-, illetve étercsoportot tartalmazó szilikagél vagy szerves polimer részecskék nagy felületi borítottassággal

*mozgófázis:* kozmotrop sókat (ammónium-, nátrium-, -acetát, -citrát, -szulfát), alkalmanként kevés alkoholt, acetonitrilt tartalmazó vizes (puffer) oldat; alacsony koncentrációjú, illékony ammónium-acetátot tartalmazó oldat (MS-kompatibilis)

*folyamat:* közepes-magas koncentrációjú sóoldat hatására a fehérjék hidrofób részei a felszínre kerülnek és különböző erősségű hidrofób kölcsönhatást alakítanak ki a mérsékelten hidrofób állófázissal, majd a fehérjék natív szerkezetük visszaállításával csökkenő koncentrációjú sógrádienssel eluálhatók

**Hidrofil kölcsönhatású kromatográfia (HILIC):**

*elválasztás alapja:* a poláris komponensek a poláris állófázis felületén kialakult víréteg és a kevésbé poláris mozgófázis közötti szelektív megoszlása

*állófázis:* poláris, porózus vagy héjszekezetű szilikagél, amino-, -diol, -amid, -ionos, -zwitterionos csoportokkal módosított szilikagél

*mozgófázis:* kevésbé poláris, elsősorban acetonitrilt (97-60%) és vizet (3-40%), esetleg puffert tartalmazó oldat

*folyamat:* a kiindulási apoláris, de kis víztartalmú mozgófázisból a minta poláris komponensei a poláris állófázishoz való nagyobb affinitásuk révén visszatartódnak, majd a mozgófázis polaritásának folyamatos növelésével (csökkenő acetonitril koncentráció) hidrofil jellegük sorrendjében eluálhatók

**Fordított fázisú kromatográfia (RPC):**

[A normál fázisú kromatográfiával szemben (poláris állófázis, apoláris mozgófázis) apoláris állófázist és poláris mozgófázist alkalmazó kromatográfiai módszer.]

*elválasztás alapja:* hidrofób kölcsönhatás

*állófázis:* apoláris, elsősorban alkilcsoportokkal (C4, C8, C18) módosított felületű porózus, héjszekezetű vagy monolit szilikagél, etilénhidas módosított szilikagél (BEH), „charged surface” hibrid szilikagél; szerves polimer (sztirol-divinil-benzol alapú)

*mozgófázis:* poláris acetonitril-víz elegy szerves savval (hangyasav, ecetsav, trifluorecetsav) vagy bázikus pufferral

*folyamat:* a peptidok/fehérjék hidrofób oldalláncú aminosavakat tartalmazó részei (vitatott mechanizmus szerint) kölcsönhatásba lépnek az apoláris állófázissal. A mozgófázis savtartalma visszاسzo- rítja a savas oldalláncok disszociációját, illetve ionpárt képeznek a bázikus oldalláncokkal, növelve a molekula hidrofób karakterét. Az acetonitril-koncentráció növelésével a komponensek növekvő hidrofóbicitásuk sorrendjében eluálhatók

Fehérjék elválasztására (esetleg izolálására) ma már az összes fent említett kromatográfiai módszer alkalmazható, peptidok elválasztására elsősorban fordított fázisú kromatográfia, IEC, újabban HILIC módszerek, illetve ezek kombinációi (multidimenziós kromatográfia), gliko- és foszfopeptidok/proteinek izolálására AC és IMAC használatosak.

**Multidimenzionális elválasztások**

A proteomikai elemzések során a minták gyakran több ezer fehérjét tartalmaznak, és proteolitikus emésztésük után akár százezer peptidet szükséges szétválasztani. A mai napig nincs olyan elválasztási módszer, amely képes lenne ennyi komponenst egyetlen analitikai dimenzióban elkülöníteni. A komponensek nem tökéletes elválasztása miatt a tömegspektrométerbe egy adott időpontban belépő több tíz-száz peptid túlterhelheti a műszer detektorát, ami a peptidazonosítások számának csökkenését eredményezi. A különböző fizikai

vagy kémiai elválasztási elveket kihasználó, ún. *ortogonális elválasztástechnikai módszerek* egymást követő alkalmazása (multidimenziós elválasztások) elegendő felbontást biztosíthat a nagyon összetett fehérje- vagy peptidkeverékek vizsgálatához. A multidimenziós elválasztások történhetnek fehérjék, illetve peptidok szintjén, de mindkét esetben a tömegspektrométerrel vizsgálandó minták komplexitásának csökkentése a cél. Az elválasztástechnikai eljárások közül az elektromigrációs (elektroforézis, izoelektromos fókuszálás) és kromatográfiás elven működő módszerek használatosak erre a célra. Kromatográfiaalapú eljárások a minta-előkészítés és az analízis során a következő célokat szolgálhatják:

- A) az LC-MS analízist befolyásoló anyagok (sók, szénhidrátok, lipidek, nukleinsavak, detergensok stb.) eltávolítása,
- B) a kis koncentrációjú fehérjék meghatározását akadályozó nagy koncentrációjú fehérjék eltávolítása,
- C) a kis koncentrációjú peptidok/fehérjék dúsítása (pl. foszforilált, glikozilált stb. származékok),
- D) peptidok és fehérjék egymástól történő hatékonyabb elválasztása.

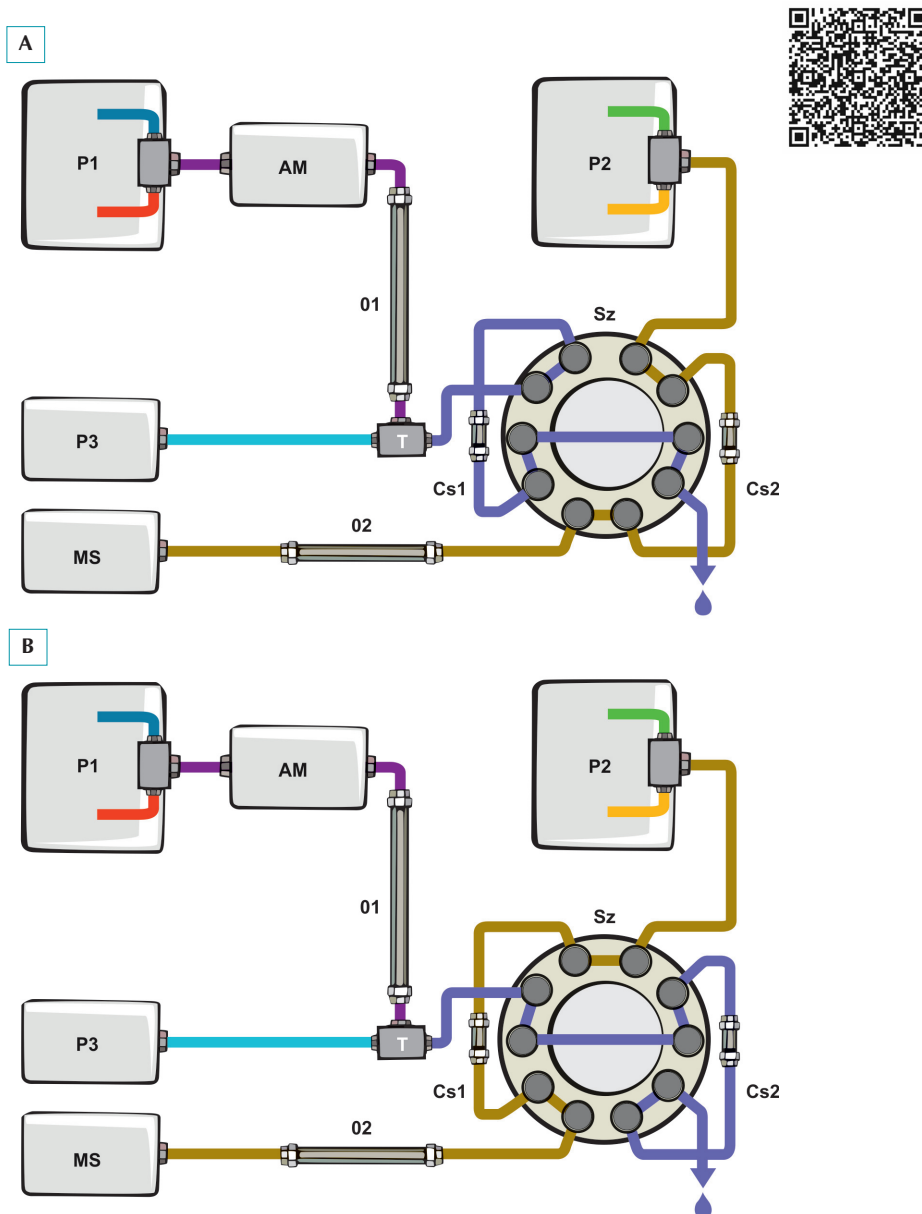
Az LC-MS analízist befolyásoló anyagok eltávolítása off-line módon szilárd fázisú extrakcióval (SPE), pl. pipettahegybe integrált RP-18 állófázison (pl. ZIP-tip, Stage-tip), illetve az analitikai RP oszloppal sorbakötött RP-csapdaoszloppal egyszerűen megvalósítható (4.7. ábra). A humán szérumfehérjék mennyiségének 90%-a 8, további 9%-a 16 fehérjétől származik, a maradék 1%-ban található az összes többi (tíz-, százazres nagyságrend). A legnagyobb koncentrációjú 6–14 fehérje (szérumalbumin,  $\alpha$ 1-antitripszin, transferrin, IgA, IgG, haptoglobin stb.) eltávolítása affinitáskromatográfiás módszerrel történhet a rájuk specifikus antitesteket tartalmazó állófázissal történő kivonással. Kis mennyiségben jelen lévő glikozilált peptidok/fehérjék specifikus izolálására leggyakrabban lektin affinitáskromatográfiát és rögzített fémkelát-képzési kromatográfiát, foszforilált termékek dúsítására  $\text{TiO}_2$  és IMAC állófázisokat használnak akár egyszerű megkötés/lemosás, akár oszlopkromatográfiás kivitelben.

Az egyszerű vagy bonyolultabb minta-előkészítés után (A, B, C műveletek) peptid/fehérjeminta még mindig nagyon komplex lehet ahhoz, hogy a tömegspektrometriás detektálás előtt egydimenziós kromatográfia elegendően nagy felbontással elválassza a komponenseket és annyira csökkentse az MS-be belépő ionok számát, hogy azok ne zavarják egymás meghatározását. Ekkor nyújthat segítséget a multidimenzionális kromatográfia, amikor is több, eltérő kromatográfiás elven működő (ortogonális) oszlopkromatográfiás rendszert kapcsolunk egymás után (off-line vagy on-line). Ekkor (elvben) az egyes oszlopkromatográfiás lépések csúskapacitásai összeszoródnak, jelentősen megnövelve az elválasztható komponensek számát és a minta vizsgálatával nyerhető analitikai információt. A multidimenziós kromatográfia két, három vagy  $n$  különböző elválasztási mechanizmusú oszlopot tartalmazhat; a többdimenziós folyadékkromatográfiában azonban leggyakrabban két oszlopot használnak. Amennyiben az a cél, hogy a minták összetételéről minél átfogóbb képet kapjunk, akkor az első dimenziós elválasztás minden részletét tovább vizsgáljuk a második dimenzióban (LCxLC, átfogó vagy „comprehensive”). Ha a cél csak egy vagy néhány peptid/fehérjecsoport további vizsgálata, akkor az ún. „heart-cutting” (LC-LC) módszert alkalmazzuk: az első dimenziós elválasztásból „kivágjuk” a vizsgálandó komponenseket tartalmazó részt és csak azt vizsgáljuk a második dimenzióban.

A multidimenziós kromatográfiás vizsgálatoknál figyelembe kell venni az egyes technikák gyakorlati korlátait. Az első megoldandó probléma a pufferek és az egyes eljárások kü-



lönböző lépéseiben használt oldószerek kompatibilitása, azaz hogy az első dimenzió elúciós puffere alkalmas legyen a második dimenzió beviteli oldószérének. Amennyiben a kromatográfia után tömegspektrometriás analízis a cél, akkor az utolsó dimenzió eluensének az-  
zal kompatibilisnek, azaz illékonynak kell lennie. Másik probléma az egyes elválasztási eljárások időtartamának helyes megválasztása: az LCxLC második dimenziójának rendszerint



**4.8. ábra.** Peptidek 2D elválasztása csapdaoszlopokon történő dúsítással.

P1, P2, P3: HPLC pumpák, Am: automata mintaadagoló, Sz: váltószep, O1, O2: pl. HILIC és RPLC oszlopok, T: T-idom, Cs1, Cs2: csapdaoszlopok (RPC), MS: tömegspektrométer



rövidebb idejűnek kell lennie, hogy az elválasztástechnikai művelet ne húzódjon nagyon el. Ahhoz, hogy a második dimenzióhoz is elegendő mennyiségű fehérje legyen, az első dimenzióban nagyobb mennyiségű mintát (nagyobb átmérőjű oszlopon) kell elválasztani.

Fehérjék on-line kétdimenziós elválasztására IEC–SEC, SCX–SEC, SEC–IEC, SEC–RPC, HIC–RPC, HILIC–RPC, IEC–RPC stb. módszerek kombinálhatók. Off-line frakcionálásukra a fenti kromatográfiás kombinációkat, de gyakran elektromigráción alapuló elválasztástechnikai módszereket (elektroforézis, izoelektromos fókuszálás vagy kromatofókuszálás) követő kromatográfiát alkalmaznak.

A fehérjék hidrolitikus bontásából származó peptidek kétdimenziós elválasztására leggyakrabban az IEC–RPC, RPC–RPC, RPC–HILIC, HILIC–RPC stb. kombinációkat használjuk, melyre egy összeállítás látható a **4.8. ábrán**. A szelep (Sz) ütemezett oda-vissza, oda-vissza fordításával az O1 oszlopról eluálódó mintakomponensek a P3 pumpa folyadékáramával (rendszerint víz) történő hígítás után hol az egyik (Cs1), hol a másik (Cs2) csapdaoszlopon gyűlnek össze. A csapdaoszlopon lévő frakciókat azután az O2 oszlopon ortogonális kromatográfiás rendszerben tovább kromatografáljuk.

Általánosságban elmondható, hogy minden egyes minta-előkészítési lépés, kromatográfiás elválasztás az egyes mintakomponensek különböző mértékű veszteségével jár együtt, ezért fontos, hogy csak a cél eléréséhez valóban szükséges műveleteket végezzük el! Az on-line kapcsolt elválasztástechnikai lépések könnyen automatizálhatók, ami kiküszöböli az emberi hibát, és drasztikusan növeli az áteresztőképességet.

Megjegyzendő ugyanakkor, hogy egy jól megválasztott 1D kromatográfiás rendszerhez on-line kapcsolt korszerű tömegspektrométerek képesek akár 40–50 000 peptidről (4–10 000 fehérje) is szerkezeti és mennyiségi információkat adni, ami ugyan még mindig csak egy kis része a proteomnak, de bizonyos esetekben elegendő ismeretet ad a mintáról.

### A kromatográfia szerepe a peptidek azonosításában

Célzott proteomikai mérések esetén (*részletek lásd a 6. fejezetben*), a célpeptidnek az adott kromatográfiás rendszerben tapasztalt retenciós ideje az analit azonosítását is szolgálja. Amennyiben van peptidszintézissel előállított standardunk, akkor előzetes mérésekből állhat rendelkezésünkre a várt retenciós idő értéke. Ha rendelkezünk izotópjelzett standarddal, akkor a mintához adva annak retenciós ideje megegyezik a nem jelzett endogén analitéval, így minden egyes mérésben rendelkezésre áll az elvárható elúciós profil. Az előzetesen megismert retenciós idő a célzott mérésekben (SIM, MRM, PRM) a prekursor ion kiválasztásának időzítését is lehetővé teszi, ezáltal csökkentve az egy adott pillanatban követendő, és növelve az egy LC-MS futás során összesen mérhető ionok számát (*részleteket lást az 6. fejezetben*).

Az átfogó, nem célzott MS mérési módok esetén (pl. DDA, DIA, *lásd 6. fejezet*) az azonosítandó és mennyiségileg meghatározandó ionok várható retenciós ideje nem áll rendelkezésre. Azonban mivel ez a paraméter egy újabb dimenziót ad az azonosítás megfelelőségének vizsgálatához, egyre több azonosító eljárás és szoftver igyekszik a kromatográfiás viselkedést is figyelembe venni. Az azonos LC-MS rendszeren gyűjtött kísérleti spektrumkönyvtár alapján történő azonosítás esetén ez nem okoz problémát, mivel a legtöbb spektrumkönyvtár a mért retenciós időt is tartalmazza, így az azonosításban felhasználható. Ugyanakkor még az azonos LC-MS rendszeren eltérő gradienssel gyűjtött adatok esetén is jelentős különbségeket tapasztalhatunk a retenciós időben. Az LC-MS rendszeren belüli és rendszerek közötti különbségek kiküszöbölése és univerzálisan használható retenciós idő skála alkalmazása érdekében vezették be az **indexált retenciós idő (IRT)** alkalmazását. Ez

azon a többnyire helytálló feltételezésen alapul, hogy azonos kromatográfiás elv (pl. RPC) alkalmazása esetén az egyes peptidek elúciós sorrendje és egymáshoz viszonyított relatív retenciós ideje azonos. Ennek megfelelően néhány kiválasztott referenciapeptid kísérletileg kapott retenciós ideje alapján a retenciós idők átszámíthatók egy relatív skálára (iRT), és a referenciapeptidek egy másik mérésben mért retenciós ideje alapján az összes peptid várható retenciós ideje is kalkulálható. Ugyanezen elvet és a peptidek retenciós idejének aminosavösszetételétől való függését alkalmazva számos szoftver próbálja jóslni a korábban kísérletileg nem detektált peptidek várható indexált retenciós idejét, ami az éppen analizált mintában megbízhatóan azonosított peptidek alapján tudnak a szoftverek abszolút skálára konvertálni, és az ezzel való egyezést a tömegspektrometriai adatok mellett az azonosítás jóságának vizsgálatára során felhasználni.

### Ajánlott irodalom

1. Kremmer T, Torkos K. Elválasztástechnikai módszerek elmélete és gyakorlata, Budapest, Akadémiai Kiadó, 2010.
2. Fekete J, Kormány R, Fekete S. Modern folyadékkromatográfia, Budapest, KromKorm Kft., 2017.
3. Szókan G, Janáky T. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia a peptidkémiaiában (A kémia újabb eredményei 79), Budapest, Akadémiai Kiadó, 1995.
4. Robards K, Ryan D. Principles and practice of modern chromatographic methods, 2nd Edition, London, Elsevier, 2022, doi: 10.1016/C2019-0-03803-4
5. Shi Y, Xiang R, Horvath C, Wilkins JA. The role of liquid chromatography in proteomics. J. Chromatogr. A, 2014; 1053:27-36, doi: 10.1016/j.chroma.2004.07.044
6. Gedela S, Medicherla NR. Chromatographic Techniques for the Separation of Peptides: Application to Proteomics. Chromatographia, 2007; 65:511-18, doi: 10.1365/s10337-007-0215-9
7. El Rassi Z, Puangpila C. Liquid-phase based separation systems for depletion, prefractionation, and enrichment of proteins in biological fluids and matrices for in-depth proteomics analysis-An update covering the period 2014–2016. Electrophoresis, 2017; 38:150-61, doi: 10.1002/elps.201600413
8. Di Palma S, Hennrich ML, Heck AJR, Mohammed S. Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. J Proteomics 2012; 75:3791-813, doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.033
9. Pirok BWJ, Gargano AFG, Schoenmakers PJ. Optimizing separations in online comprehensive two-dimensional liquid chromatography, J Sep Sci, 2018; 41:68-98, doi: 10.1002/jssc.201700863
10. Shan L, Jones BR. Nano-LC: An updated review. Biomed Chromatogr, 2022; 36:e5317, doi: 10.1002/bmc.5317
11. Sanders KL, Edwards JL. Nano-liquid chromatography-mass spectrometry and recent applications in omics investigations. Anal Methods 2020; 12:4404-17, doi: 10.1039/d0ay01194k

## 5. TÖMEGSPEKTROMETRIAI ALAPOK

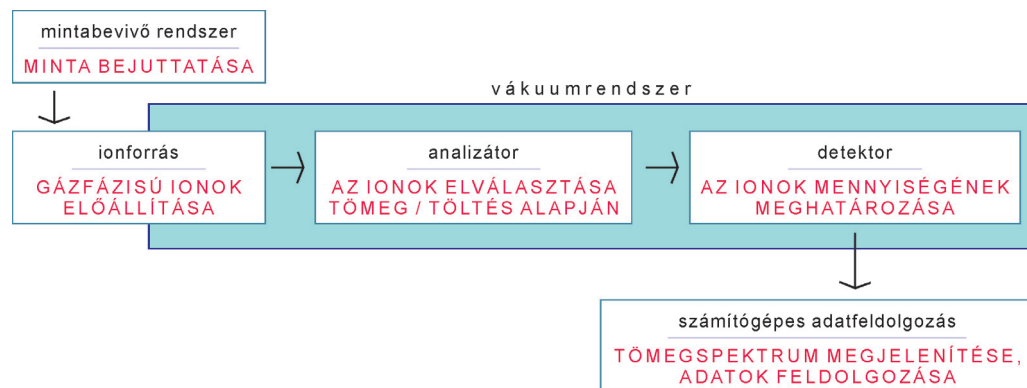
Drahos László,  
Turiák Lilla,  
Révész Ágnes,  
Tóth Gábor

### Bevezetés – a tömegspektrométer felépítése

A tömegspektrometria (MS, mass spectrometry) egy nagyműszeres szerkezetvizsgáló és analitikai módszer, amely egyre nagyobb teret hódít a molekuláris biológia, proteomika területén. A tömegspektrometriás analízis előnye, hogy kis anyagmennyiségű komplex biológiai minták komponenseinek kvalitatív és kvantitatív meghatározására egyaránt alkalmas. Az MS analízis mellett szól a rövid analízis idő, az extrém érzékenység és a kromatográfiával történő kapcsolás (lásd 4. fejezet) lehetősége is. További előnye, hogy kifejezetten szelektív technikának tekinthető, ugyanis nagyon kis szerkezeti (molekulatömegbeli) különbségek kimutatására és párhuzamos elemzésére alkalmas. Hátránya, hogy a nagyszámú spektrum értékelése bonyolult feladat, és sok esetben csak korlátozott szerkezeti információ nyerhető. A fehérjék/peptidek vizsgálata azonban jól automatizálható és az – azonosításhoz szükséges – részleges szekvencia meghatározás ma már rutin feladatnak tekinthető.

**A tömegspektrométer érzékenysége (kimutatósi határ):** A tömegspektrométer egyike a legérzékenyebb analitikai és szerkezetvizsgáló technikáknak, segítségével attomolnyi ( $10^{-18}$  mol) vagy még kisebb anyagmennyiségek is kimutathatók. A nagy érzékenységnek azonban vannak hátulütői is: nagyon tiszta oldószerekkel, vegyszerekkel, enzimekkel kell dolgozni. A kimutatósi határt sok esetben nem a tömegspektrométer abszolút érzékenysége, hanem a „környezet” tisztasága (előző injekciók maradéka, oldószerek tisztasága, háttérszennyezők stb.) határozza meg.

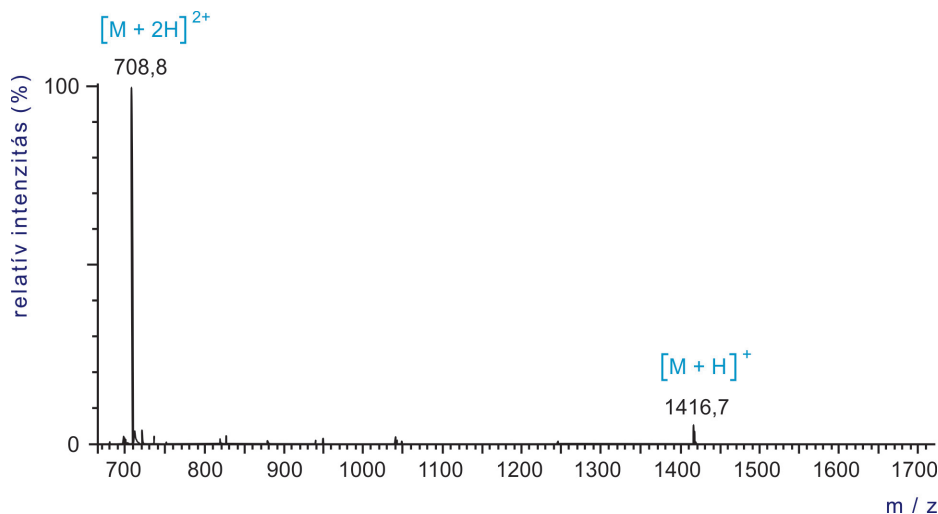
A tömegspektrométer általános felépítése az 5.1. ábrán látható. A tömegspektrométer működése során a semleges részecskékből (amelyek lehetnek atomok, molekulák, makromolekulák, akár molekula komplexek is) ionokat állít elő, majd az ionok, valamint – a belőlük esetlegesen bomlással képződő – ún. fragmens (töredék) ionok tömeg/töltésének és mennyiségének meghatározását végzi el. A vizsgálandó mintát egy mintabevivő rendszeren



5.1. ábra. A tömegspektrométer sematikus felépítése és a részegységek funkciója

keresztül az ionforrásba juttatjuk. A mintabevivő rendszer lehet direkt adagolás vagy valamilyen kromatográfiás rendszer (pl. HPLC) is. A proteomikában a mintabevivő rendszer leggyakrabban nanoáramlásos ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográf (nanoUHPLC-MS). Az ionforrás feladata gázfázisú ionok előállítása, amelyek ezt követően az analizátorba kerülnek, ahol tömeg/töltés szerinti elválasztásuk történik meg. A detektorban az így elválasztott ionok válaszjelének (mennyiségének) meghatározása történik.

A tömeg/töltés ( $m/z$ ) érték egyetlen ion tömegének és töltésének a hányadosa, az így kapott adatokat tömegspektrumon (5.2. ábra) ábrázolhatjuk: az ion tömeg/töltésének függvényében ( $x$  tengely) ábrázoljuk az adott ion intenzitását ( $y$  tengely).



**5.2. ábra.** GNPTVEVELTTEK szekvenciájú peptid tömegspektruma. A spektrumban az egyszeres töltésű ( $[M + H]^+$ ) és a kétszeres töltésű ( $[M + 2H]^{2+}$ ) proton addukt egyaránt észlelhető.

#### Atomi tömegek:

Az atomi tömegek számítása során az SI tömegmértékegység (kg) használata – a nagyon kis számok miatt – nem praktikus, ezért a tömegspektrometriában az **egységes atomi tömegegység** (unified atomic mass unit) használata terjedt el. Az egységes atomi tömegegység az alapállapotban lévő  $^{12}\text{C}$  izotóp tömegének egytizenketted része. A mértékegysége  $u$  vagy (*John Dalton* tiszteletére)  $Da$  (*Dalton*). A definíciója megegyezik az atomi tömegállandó (atomic mass constant) definíciójával:

$$m_u = m(^{12}\text{C}) / 12 = 1\text{Da} = 1u \approx 1,660 \cdot 5402(10) \times 10^{-27} \text{ kg}$$

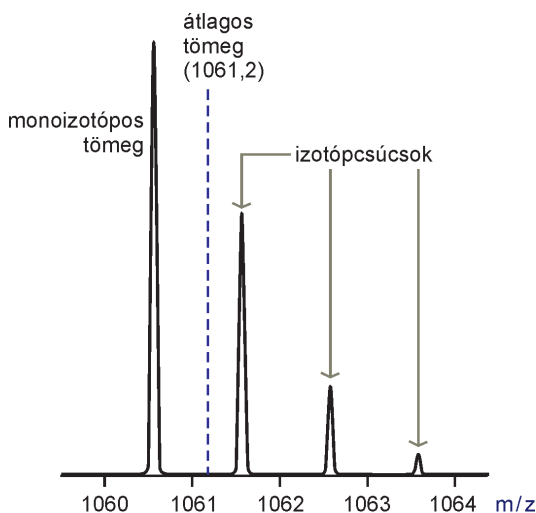
A tömeg/töltés SI mértékegysége  $\text{kg/C}$ , ami (a fentiek miatt) szintén nem praktikus a tömegspektrometriában, ezért az atomi tömegegység/töltésszámot szokás használni, aminek a mértékegysége (*Joseph John Thomson* tiszteletére):  $Th$  (*Thomson*).

### A tömegspektrometria alapjai, módszerei, alapfogalmak, definíciók

A tömegspektrométer ionforrásában egyaránt képződhetnek pozitív és negatív töltésű, gyök- és zárthéjú, illetve egyszeresen, valamint többszörösen töltött ionok. A keletkező ionok töltése alapján megkülönböztetünk pozitív és negatív ionizációt, melyek során értelemszerűen pozitív vagy negatív ionok képződnek. A proteomikai vizsgálatok során leggyakrab-

ban olyan technikákat használunk, amelyben pozitív töltésű, zárthéjú ionok képződnek. Így a következőkben csak ezekkel foglalkozunk részletesen. A töltést proton vagy valamilyen kation (pl.  $\text{Na}^+$  vagy  $\text{K}^+$ ) hordozzák, és a vizsgálandó molekulával egy adduktot alkotnak:  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{K}]^+$ . Elektroporlasztásos ionizáció esetén nagyon gyakran észlelhetők többszörös töltésű ionok is, amelyben egynél több töltést hordozó részecske kapcsolódik a molekulához (pl.  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ,  $[\text{M}+n\text{H}]^{n+}$ ).

A természetben megtalálható stabil izotópok a tömegspektrometriában lényegesen fontosabb szerepet töltenek be, mint általában a kémiában, mivel ezek az izotópok a tömegspektrumban megjelennek és észlelhetők. Például a szerves vegyületekben található szénatomnak két stabil izotópja létezik a természetben: a  $^{12}\text{C}$  és  $^{13}\text{C}$  izotópok, melyek 98,93:1,07 arányban fordulnak elő. A két izotóp ugyan kémiai tulajdonságaiban alig, de tömegében jelentősen eltér egymástól ( $\sim 1$  Da tömeggel), ezért a tömegspektrumban ezek jól megkülönböztethetők. Mivel a szerves vegyületeket felépítő atomoknak több stabil izotópja létezik, ezért a szerves molekulák a tömegspektrumban nem egy adott csúcsként, hanem egy csúcsköteggént jelentkeznek (5.3. ábra).



5.3. ábra. A bradikinin peptid izotópcsúcsai a tömegspektrumban

A legkisebb tömegű izotópok figyelembevételével számított molekulatömeg az ún. monoizotópos tömeg, a tömegspektrumban ennél a tömegnél észlelhető csúcsot monoizotópos csúcsnak nevezzük. Az ennél nagyobb tömegű további izotópcsúcsokat, pedig egyszerűen csak izotópcsúcsnak hívjuk. Az összes izotóp figyelembevételével számított molekulatömeg az ún. átlagos tömeg.

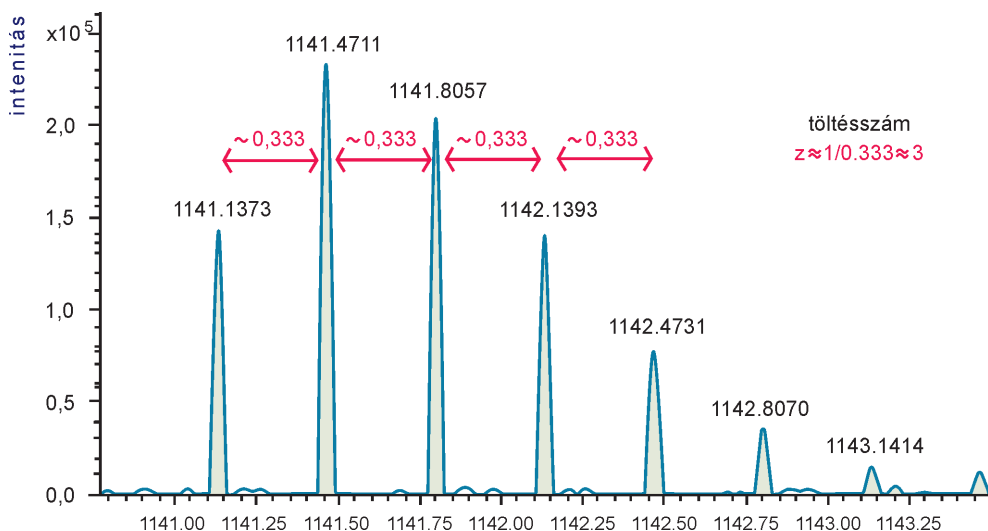
Többszörös töltésű ionok esetén az izotópcsúcsok segíthetnek az ion töltésszámának meghatározásában. Egyszeres töltésű ionok esetén az izotópcsúcsok közötti távolság közelítőleg  $1\text{ } m/z$ , kétszeres töltésű ion esetén  $1/2\text{ } m/z$ ,  $z$  töltés esetén pedig  $1/z$ . A 5.4. ábrán látható spektrum esetén az izotópcsúcsok kb.  $0,333\text{ Da}$  távolságban helyezkednek el egymástól, ez alapján az ion töltésszáma egy egyszerű képlettel meghatározható:

$$z = 1/0,333 \approx 3$$

A töltésszám, valamint a töltést hordozó részecske tömeg/töltésének ismeretében a vizsgált molekula tömege a következő képlet segítségével határozható meg:

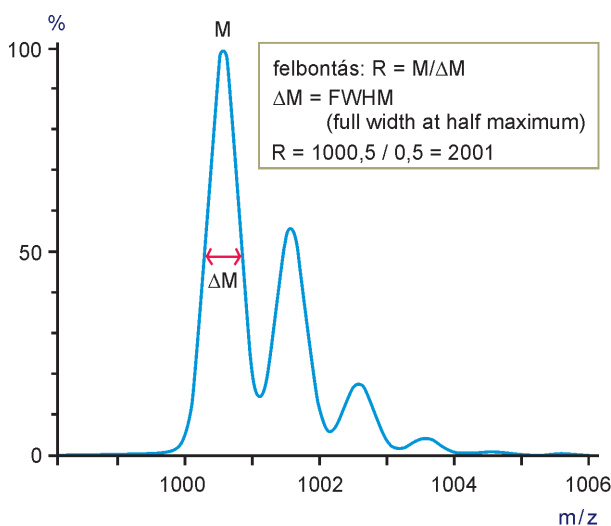
$$M = z \times (M_{\text{mért}} - M_t)$$

ahol a  $z$  a töltésszám,  $M_{\text{mért}}$  a mért tömeg/töltés érték,  $M_t$  a töltést hordozó részecske tömege (itt  $H^+$ ). Ez alapján – a képletbe behelyettesítve – az ábrán vizsgált peptid monoizotópos csúcsának tömege  $M = 3 \times (1141,1373 - 1,0078) = 4230,3885$  Da.



5.4. ábra. Töltésszám meghatározása az izotópcsúcsok távolságából

A tömegspektrométerek egyik fontos paramétere a felbontása ( $R$ ), ugyanis az MS spektrumban látható csúcsok nem vonalszerűek (centroid), hanem (legtöbbször) Gauss-eloszlást követő pontthalmazok (folytonos, kontinuum). Ezen csúcsok szélessége elsősorban az anali-



5.5. ábra. A felbontás definíciója és meghatározásának menete

zátor típusától és a készülék hangolásától függ, és alapvetően befolyásolja a megkülönböztethető szerkezeti különbségeket. A felbontás definíciója és meghatározásának módszere az **5.5. ábrán** látható. A számítás során a tömegspektrometriás csúcs tömeg/töltés értékét ( $M$ ) elosztjuk az 50%-os magasságnál vett csúcszélességgel (FWHM).

10 000 feletti felbontás esetén beszélünk nagyfelbontásról, amely lehetővé teszi, hogy az adott ion tömegét pontosan (0,1–5 ppm hibával) meghatározzuk. Ennek az előnye, hogy a pontos tömeg értékből az elemi összetétel meghatározható. Minél nagyobb a felbontás, annál nagyobb valószínűséggel különböztethető meg két (kis mértékben eltérő  $m/z$ -jú) ion, azáltal, hogy két a valósághoz közelebb álló  $m/z$ -t mérünk egy átlagos érték helyett.

#### A tömegpontosság és felbontás fontos szempont!

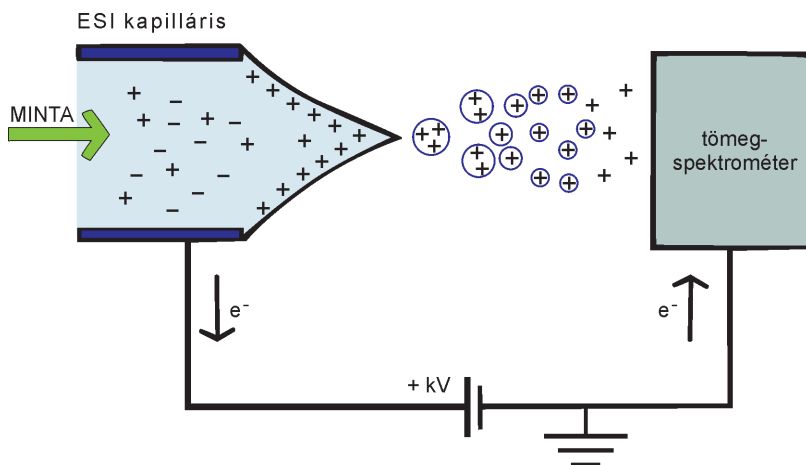
A proteomikában a tömegspektrométer tömegpontossága és felbontása is nagyon fontos szempont. A nagyfelbontás nemcsak a tömegpontosság miatt szükséges, hanem azért is, hogy az adott ion töltésszáma egyértelműen meghatározható legyen. Kisfelbontású készüléket használva – különösen bonyolult minták vizsgálata során – sok téves töltésszám-azonosítás következhet be. A tömegpontosság a peptidiek szekvencia meghatározásánál játszik kulcsszerepet, hiszen minél pontosabban határozzuk meg az ismeretlen peptid és fragmenseinek tömegét, annál megbízhatóbban végezhető el a szekvencia meghatározása.

### Ionizációs módszerek

A fehérjék és peptidiek vizsgálatára napjainkban az *elektroporlasztásos ionizációt* (*electrospray, ESI*), valamint ennek *nanoáramlásos verzióját* (*nanoESI*) és a mátrixszal segített lézerdeszorpciós ionizációt (MALDI) alkalmazzuk. A MALDI és ESI ionizációs módszerek kidolgozásáért *Koichi Tanakát* és *John Fennt* 2002-ben megosztott Nobel-díjjal tüntették ki. A következőkben ezen ionforrások tulajdonságait és működését tekintjük át részletesen.

#### ■ Elektroporlasztásos ionizáció (Electrospray, ESI)

A porlasztáson alapuló elektroporlasztásos ionforrás a proteomikai kutatásokban leggyakrabban alkalmazott ionizációs technika. A folyékony halmazállapotú mintaoldat kapillárison keresztül jut az ionforrásba, ahol nagy feszültség alkalmazása, porlasztó gáz és fűtés



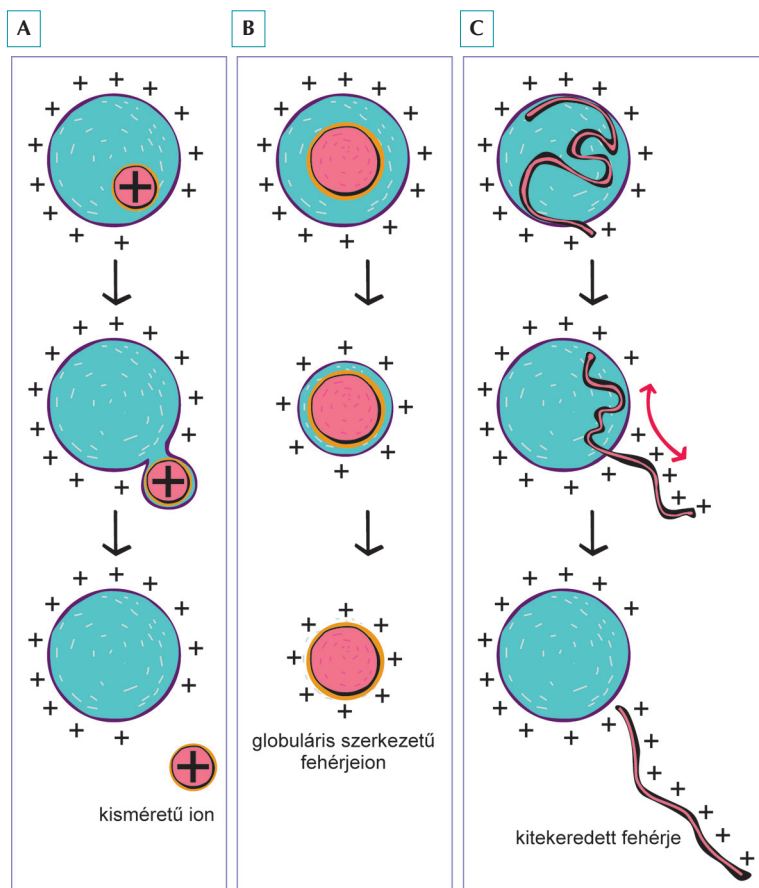
**5.6. ábra.** Az elektroporlasztásos ionizáció sematikus működése

(az *Anal. Chem.* 2013, 85, 1, 2–9 engedélyével adaptálva. Copyright 2013, American Chemical Society)

segíti az ionizációt. A kapilláris és a vele szemben elhelyezkedő ellenelektrod között elektrosztatikus tér jön létre és ennek következtében a kapillárisból kilépő folyadékból töltéssel rendelkező cseppek képződnek (5.6. ábra).

Az elektroporlasztásos ionizáció esetén az ionképződés mechanizmusa háromféle modellel magyarázható:

1. *Ionpárolgási modell (ion evaporation model, 5.7. ábra, A):* A töltött aeroszol csepp egy kisebb oldószert cseppet lök ki magából, amelynek következtében az összes oldószert elpárolgása után többszörösen töltött ionok jönnek létre az ionforrásban. Ez a mechanizmus elsősorban kisméretű ionok esetén jellemző.
2. *Töltésmaradvány modell (charge residue model, 5.7. ábra, B):* A többszörösen töltött cseppek párolognak, és egy adott kritikus méretet elérve (amikor a töltésterhelés nagyobb, mint a felületi feszültség) „szétrobbannak”. Ezt hívjuk Coulomb-robbanásnak. Ennek eredményeként egyre kisebb méretű cseppek jönnek létre, és a folyamat végén a minta (proton vagy kation) adduktjai (pl.  $[M+H]^+$ ) képződnek. A globuláris szerkezetű fehérjék elsősorban ezzel a mechanizmussal ionizálódnak.



**5.7. ábra.** Ionképződés mechanizmusai ESI ionizáció esetén. A: Ionpárolgási modell: kisméretű ion kilökődése a töltött cseppből. B: Töltésmaradvány modell: globuláris fehérjék esetén jellemző. C: Lánckilöködési modell: kitekertett fehérje kilökődése  
(az Anal. Chem. 2013, 85, 1, 2–9 engedélyével adaptálva. Copyright 2013, American Chemical Society)



3. *Lánckilökődési modell (chain ejection model, 5.7. ábra, C):* Bizonyos kísérleti körülmények között a globuláris szerkezetű makromolekulák lineáris konformációt vehetnek fel („kitekerednek”), ami megváltoztatja a fehérje felszínének tulajdonságát hidrofílról hidrofóbra. A kitekeredett láncok a hidrofób tulajdonságuk miatt azonnal a csepp felszínére vándorolnak. Ezt követően az egyik láncvég kikerül a gázfázisba, amit a maradék fehérje gyors kilökődése követ. A lánckilökődési modell gyors és hatékony folyamat, ezért nagy intenzitású, sokszorosan töltött ionok képződnek. Lineáris szerkezetű fehérjék esetén ez a legvalószínűbb ionizációs folyamat.

Az elektroporlasztásos tömegspektrometria nagyon érzékeny módszer ( $10^{-15}$ – $10^{-18}$  mol), mely kis és nagy tömegű molekulák, pozitív és negatív ionok, erősen poláris/ionos komponensek vizsgálatára is alkalmas. Előnye, hogy könnyen kapcsolható kromatográfiával, és mennyiségi meghatározásra is alkalmas. Fontos tulajdonsága, hogy kevésbé tolerálja a szervesen sókat és a nem illékony szennyezőket, ezért a kromatográfiás rendszerben csak illékony puffer használható (pl. ammónium-formiát, ammónium-acetát). Az ionizációs folyamat során többszörösen töltött molekulaionok is keletkezhetnek, ezért alkalmas nagy molekulatömegű proteinek, glikoproteinek, oligonukleotidok, polimerek szerkezeti meghatározására. Az ESI ionforráson keresztül a tömegspektrométer folyadékkromatográffal közvetlenül kapcsolható, ezt nevezzük HPLC-MS-nek (*részletek a 4. fejezetben olvashatók*).

Az ESI ionizáció nanoáramlású változatát nanoESI ionizációnak nevezzük. Tulajdonságaiban a normál ESI ionizációhoz hasonlít, a kisebb áramlási sebesség (200–600 nl/perc) miatt a kapilláris átmérője kisebb, ezért könnyebben eltömődhet, és az alkalmazott nagyfeszültség pontos beállítására is jóval érzékenyebb. A nanoESI legnagyobb előnye, hogy az ionizációs határfoka lényegesen nagyobb, mint az ESI ionforrásé (áramlási sebességtől függően akár 100-szoros is lehet). A nanoESI-hez alkalmazott kisebb átmérőjű tű esetén kisebb oldószercseppek keletkeznek az elektroporlasztás során, így növelve az ionizáció hatékonyságát (a bevitt molekulák nagyobb részhányada ionizálódik). Emellett a tű közelebb helyezhető az ionoptikához és pontosabban pozícionálható, aminek köszönhetően a keletkezett ionok jobb hatásfokkal jutnak be a tömegspektrométerbe. Mindezek eredményeként lényegesen kisebb anyagmennyiség vizsgálható a nanoESI segítségével, mint a szokványos ESI forrás alkalmazásával.

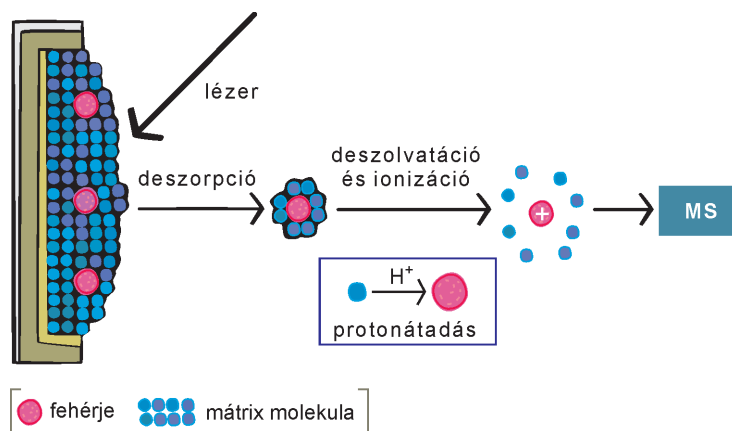
#### **Ionszuppresszió (ionelnyomás):**

Az ionszuppresszió a vizsgálandó minta mellett jelen lévő komponens(ek) (pl. mátrix) hatására bekövetkező detektorválasz vagy jel/zaj viszony csökkenést jelent. Az ionelnyomást okozhatja a mintában lévő adalékanyag, só vagy más szennyező anyag jelenléte. Az ionelnyomó hatás minimalizálható az ESI körülmények optimalizálásával, például az áramlási sebesség és az oldat pH-értékének beállításával. Ezenkívül különböző mintatisztítási technikák, például a szilárd fázisú extrakció alkalmazása szintén segíthet az ionszuppresszió csökkentésében.

Az ionszuppresszió mechanizmusa nem ismert pontosan, egy lehetséges magyarázat alapján a különböző molekulák „versenyeznek” a töltésekért. Az ESI és MALDI ionizáció esetén a töltött részecske képződése egyaránt ion-molekula ütközéssel járó reakció eredménye. Például protonaddukt képződése esetén ezen reakció sebességének logaritmus arányos a molekula protonaffinitásával, azaz a nagy protonaffinitású molekula jobban ionizálódik, mint a kis protonaffinitású molekula. Ezt úgy is fogalmazhatjuk, hogy a nagy protonaffinitású molekula elnyomja a kis protonaffinitású molekula jelét. Fontos megjegyezni, hogy ha a tömegspektrumban két azonos intenzitású csúcs észlelhető, az nem jelenti azt, hogy a mennyiségük is megegyezik, akár 5 nagyságrendi különbség is lehet közöttük!

## ■ Mátrixszal segített lézerdeszorpció és ionizáció (MALDI)

1988-ban Tanaka és a tőle függetlenül tevékenykedő Hillenkamp és mtsai nagy molekulatömegű biomolekulák ionizációjára alkalmas, ún. mátrixszal segített lézerdeszorpció/ionizációs ionforrást fejlesztettek ki. A MALDI módszer legnagyobb előnye, hogy kiválóan alkalmas szintetikus makromolekulák és proteinek vizsgálatára, a nagy molekulatömegű inakt fehérjék vizsgálatának gyakran alkalmazott ionizációs módszere. A mintát egy olyan molekulával kristályosítjuk együtt, amely az alkalmazott lézer hullámhosszán erős fényelnyelést mutat (pl. nikotinsav, fahéjsav, 2,5-dihidroxi-benzoészav). Ezekben a mátrixokban a minta bomlása minimális, és az ionizálódott mátrixmolekulák gázfázisban segítik a minta ionizációját. A lézerpulzus hatására a kristályos anyagban először deszorpció történik, azaz a minta molekulái a mátrixszal együtt lépnek át a gázfázisba (5.8. ábra). Ezt követően deszolvatáció következik be, és a mátrixmolekula töltést ad át a vizsgálandó molekulának. A MALDI érzékeny módszer,  $10^{-15}$ – $10^{-21}$  mol mennyiségű minta kimutatására alkalmas pozitív és negatív üzemmódban. Főként egyszeres, esetleg kétszeres töltésű ionok, protonált, gyakran kation adduktok (pl.  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ) láthatók a spektrumban, fragmentáció nem jellemző.



5.8. ábra. A MALDI ionizációs technika elvi ábrája

A módszer előnye, hogy nagy tömegű molekulák vizsgálatára is alkalmas (akár több millió Da tömegig), toleráns sószennyezésre (mM koncentrációban), és alkalmas keverékek direkt analízisére. Hátránya, hogy on-line nem kapcsolható elválasztástechnikai módszerekkel, mivel a vizsgálat előtt a minta kristályosítása szükséges. Hátránya továbbá, hogy nagy tömegű molekulák esetén a molekulacsúcs széles lehet, valamint mennyiségi meghatározásra csak nagyon korlátozottan alkalmas. Az ESI-vel történő mérések reprodukálhatósága jobb, mint a MALDI ionforrással történő analíziséké a MALDI-nál alkalmazott kristályosítás rossz reprodukálhatósága miatt. A MALDI ionforrást leggyakrabban repülési idő analízátorral (Time of Flight, TOF) kapcsolják.

### MALDI vagy ESI ionizációt használjunk?

HPLC-MS kapcsolat esetén az (nano)ESI a jó választás, a MALDI speciális – ESI-vel nehezen ionizálható – (bio)polimerek vizsgálata esetén előnyös. A MALDI a sószennyezőket jobban tolerálja. Néhány százszázas molekulatömegű fehérje vizsgálatára mindkét technika jól használható, e felett azonban már nem rutinszerű a vizsgálat.

## Analizátorok

Az analizátor feladata a tömegspektrométerben az ionok elválasztása tömeg/töltés alapján. Ezen kívül a különböző tandem tömegspektrometriás mérési módok megvalósítását is az analizátorok teszik lehetővé, ezért alapvetően határozzák meg a tömegspektrométer lehetőségeit. A különböző analizátorok legfontosabb tulajdonságai az **5.1. táblázatban** láthatók. Megkülönböztetünk kis ( $R < 10\,000$ ) és nagyfelbontású analizátorokat ( $R > 10\,000$ ). A kisfelbontású analizátorok közé tartoznak a *kvadrupól* (*Q*, *quadrupole*) és *ioncsapda* (*IT*, *ion trap*) analizátorok. A kvadrupól analizátor legnagyobb előnyei a nagy lineáris dinamikus tartománya, ami akár 7 nagyságrend is lehet, valamint az alacsony árak. Így a kvadrupól analizátorral rendelkező tömegspektrométerek leggyakoribb felhasználása a célzott (a mintában elvártan jelen lévő) fehérjék kvantitatív meghatározása. Az ioncsapda analizátorok speciális soklépéses, ún.  $MS^n$ , tandem tömegspektrometriás vizsgálatokra is alkalmasak (lásd lent), ezért speciális szerkezetfelfedezési célokra jól alkalmazhatók. A *repülési idő* (*TOF*, *time of flight*), *Orbitrap*<sup>TM</sup> és *ion ciklotron rezonancia* (*ICR*, *ion-cyclotron resonance*) analizátorok nagyfelbontásra, így pontos tömeg (elemi összetétel) meghatározásra is alkalmasak. A repülési idő analizátor rendelkezik a legnagyobb mérési tömegtartománnyal, ezért nemkovalens fehérjekomplexek vizsgálatára előszeretettel alkalmazzák. Ezenkívül ez az analizátortípus képes a leggyorsabb spektrumfelvétellel, amiből az következik, hogy az ún. adatfüggetlen módban történő mérésre a legalkalmasabb (*részletek a 6. és 11. fejezetben olvashatók*). Az ion ciklotron rezonancia analizátor a felbontásban jeleskedik (akár 39 millió is lehet). Az *Orbitrap*<sup>TM</sup> analizátor egyik paraméterben sem adja a legnagyobb értéket, de mindenben jól teljesít, ezért a proteomikában – a TOF analizátorok mellett – nagyon népszerűek.

**5.1. táblázat** A leggyakrabban használt analizátortípusok összehasonlítása

Tulajdonság	Analizátor típusa				
	Q	IT	TOF	Orbitrap	ICR
Nagyfelbontás	–	–	+	++	+++
Pontos tömegmérés	–	–	+	++	+++
Nagy mérési tömegtartomány	+	+	+++	+	++
Gyors spektrumfelvétel	++	++	+++	+	+
Nagy lineáris dinamikus tartomány	+++	+(+)	++	+	+
Alacsony beszerzési ár	+++	++	+	+	–
Népszerű a proteomikában	–	+	++	+++	–

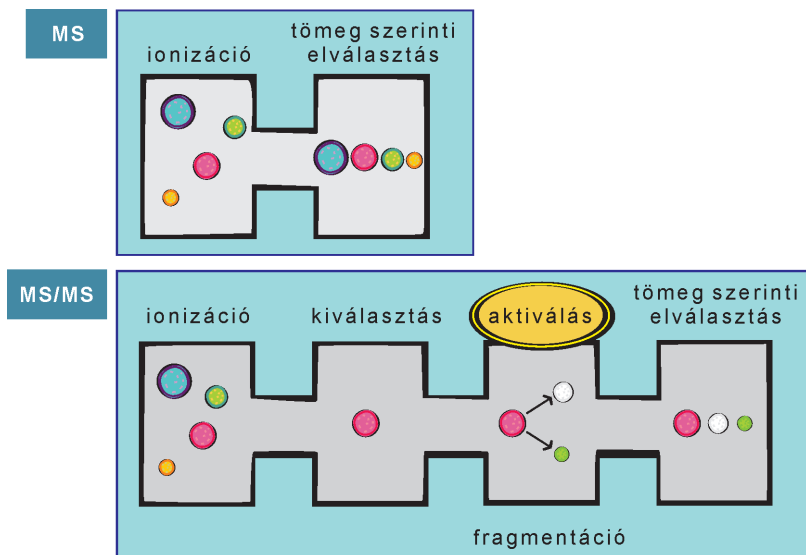
A modern tömegspektrométerek – különösen a proteomikában alkalmazottak – tipikusan nem csak egy analizátort tartalmaznak, hanem többet is. Például az ún. Q-TOF berendezésben egy kvadrupól analizátor mellett repülési idő analizátor is található. A kvadrupól normál spektrum felvételekor minden iont átenged, míg a később tárgyalt tandem tömegspektrometriás mérés esetén csak a kiválasztott tömeg/töltésű iont engedi át.

**Melyik analizátor a legjobb?**

Erre a kérdésre nem lehet egyértelmű választ adni, hiszen az **5.1. táblázatból** is látható, hogy mindegyik analizátornak egyaránt vannak előnyei és hátrányai is. A megoldandó feladattól, az alkalmazni kívánt mérési módtól függően kell a feladatra a legalkalmasabb típusú tömegspektrométert kiválasztani!

**Tandem tömegspektrometria**

Az új ionizációs lehetőségek, ill. a műszertechnikai fejlesztések lehetővé tették a tandem tömegspektrometria (MS/MS) szélesebb körű elterjedését, amely a vizsgált vegyületről a korábbinál sokkal részletesebb információt szolgáltat. Tandem tömegspektrometriának nevezzük azokat a módszereket, amelyek során gázfázisú fragmentációs folyamatokban prekursor–fragmens ion kapcsolat határozható meg. A hagyományos tömegspektrometria (MS) és tandem tömegspektrometria (MS/MS) közötti különbség a **5.9. ábrán** látható:



**5.9. ábra.** A hagyományos és tandem tömegspektrometriás mérés összehasonlítása

A hagyományos tömegspektrometriás kísérletek esetén az ionizációt követően az ionforrásban képződő ionokat „azonnal” tömeg szerint elválasztjuk és detektáljuk. Tandem tömegspektrometria esetén az ionizációt követően kiválasztjuk azt az iont, amelynek szerkezetét meg akarjuk határozni (piros kör) és csak ezt az iont gerjesztjük/fragmentáltatjuk. Az így nyert fragmenseket  $m/z$  értékük szerint szétválasztjuk. Ebben a példában a prekursor ion kiválasztása, gerjesztése (aktiválása) és a képződő fragmensek mérése a tömegspektrométer külön térrészeiben történik (ezt nevezzük *térbeli tandem tömegspektrometriának*). Ioncsapda készülék esetén azonban a tandem tömegspektrometria egy analizátorban, időben egymást követően történik (ezt nevezzük *időbeli tandem tömegspektrometriának*).

Az ioncsapda típusú analizátorok alkalmazásával lehetőség nyílik a keletkező fragmens ionok további fragmentációjára, elméletileg tetszőleges számú lépésben ( $MS^n$  technika) követve az adott prekursor ionból keletkező fragmenseket. Gyakorlatban azonban 3 kiválasztás-

tás-gerjesztés ciklusnál ( $MS^3$ ) ritkán végeznek többet, mivel az ionok mennyisége minden egyes lépésben csökken ezzel meghatározva a maximális ciklusok számát.

Ily módon, tandem tömegspektrometriával az adott ionnak nemcsak a tömegéről, hanem szerkezetéről is információt kaphatunk, pl. anyagkeverékek vizsgálata esetén  $MS/MS$  technikával az egyes komponensekről „tisztá” spektrum nyerhető. Egyes jellegzetes fragmentációs folyamatok tandem tömegspektrometriával történő monitorozásával adott szerkezeti egységet tartalmazó molekulák azonosíthatók vagy kvantitatívan meghatározhatók.

Az ionok belső energiája (gerjesztettsége) jelentős szerepet játszik a fragmentációs folyamatok során. Ha az ion belső energiája nagy, akkor spontán bomlás következik be. [Például a MALDI- $MS/MS$  ún. PSD (post-source decay) vizsgálatok esetén az ionok spontán bomlását kihasználva történik a tandem tömegspektrum felvétele.] Abban az esetben, ha ez nem elég a fragmentációhoz, akkor ún. másodlagos gerjesztés (aktiválás) alkalmazása szükséges. A gerjesztés történhet gázmolekulákkal (collision-induced dissociation, CID), felülettel (surface induced dissociation, SID), fotonokkal (infrared multiphoton dissociation, IRMPD), illetve elektronokkal történő ütköztetéssel (electron transfer dissociation, ETD és electron-capture dissociation, ECD). A proteomikában használt főbb aktiválási módokról és hatásukra a peptidekben végbemenő fragmentációról a 7. fejezetben olvashatunk részletebben.

Proteomikában a nagyszámú tandem tömegspektrum felvétele adatfüggő vagy adatfüggetlen mérési technikával történik. Az első esetben (adatfüggő mérési mód) a tandem tömegspektrum felvétele valamilyen előre meghatározott feltétel alapján történik meg, pl. ha a HPLC-ről eluálódó csúcs intenzitása elér egy küszöbértéket akkor tandem tömegspektrum készül róla. Az adatfüggetlen mérési mód esetén a csúcs intenzitásától függetlenül készül tandem tömegspektrum a csúcsookról, ill. csúcsok keverékéről. Ennek a technikának a részletei a 6. fejezetben találhatók.

Összefoglalásként elmondható, hogy a tömegspektrometria – kromatográfiás technikákkal kapcsolva – érzékenysége, robusztusságának és szelektivitásának köszönhetően széles körben alkalmazható biológiai rendszerek komplex analízisére. Napjainkban a proteomikai kutatásokban a módszer nélkülözhetetlenné vált, és egyre gyakrabban használják orvosi diagnosztikai célokra is.

### Ajánlott irodalom

1. Buday L, Nyitrai L, Perczel A (szerk.). Ezerarcú fehérjék. Első kiadás, Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió, 2018.
2. Greaves J, Roboz J. Mass Spectrometry for the novice. CRC Press, New York, 2014.
3. Jürgen H, Gross JH. Mass Spectrometry: A textbook. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2004.
4. Ardrey RE. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: An Introduction. John Wiley & Sons, 2003.
5. Vékey K, Telekes A, Vertes A (szerk.). Medical applications of mass spectrometry. Elsevier, Amsterdam, 2008.

## 6. TÖMEGSPEKTROMETRIÁS ADATGYŰJTÉSI TECHNIKÁK

Kalló Gergő

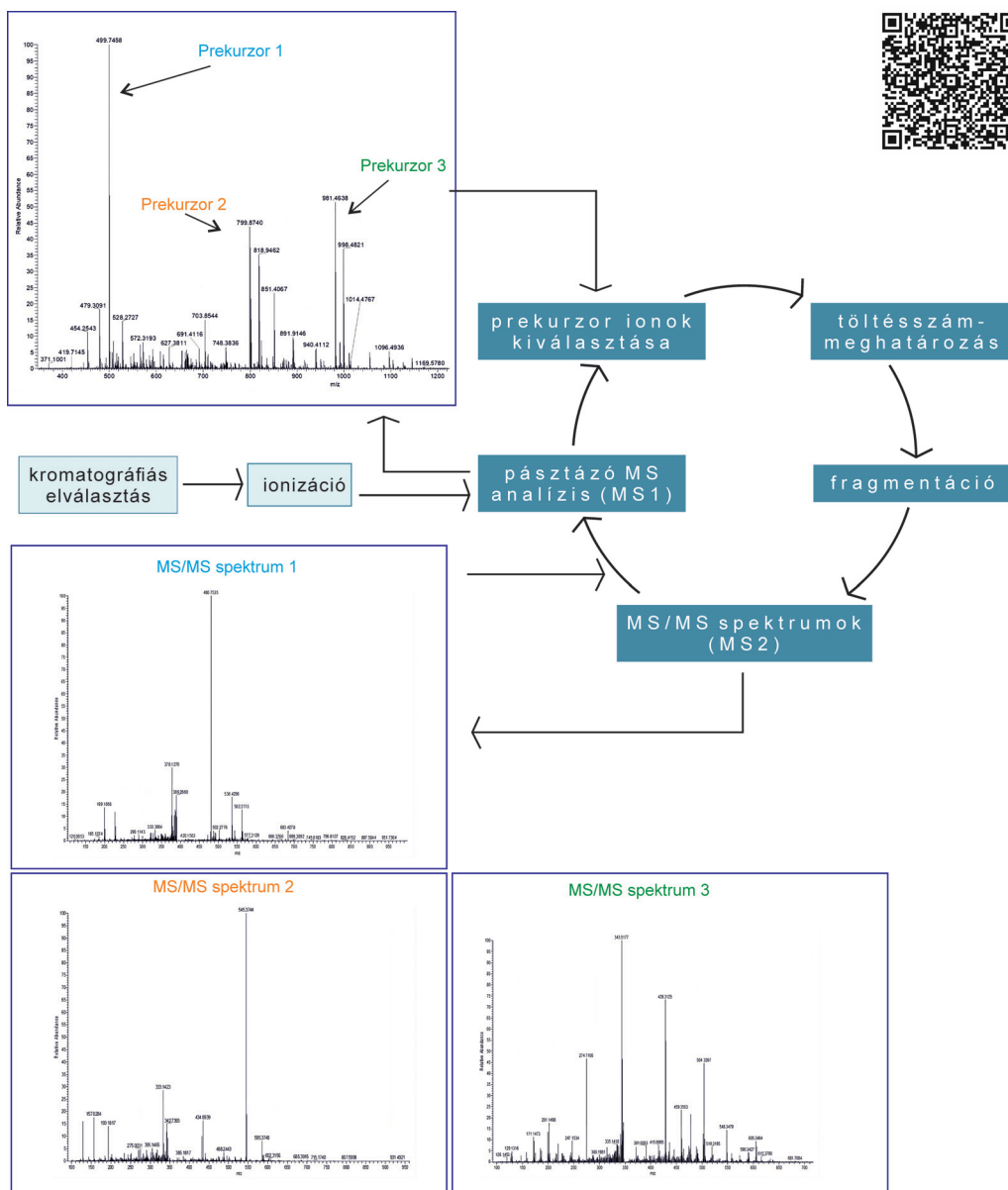
Az omikák térhódításával napjainkban egyre több kutatónak van lehetősége globális proteomikai analízisek tervezésére és kivitelezésére, ezáltal rendszerszinten vizsgálva a fehérjeprofilokban bekövetkező változásokat. Azonban, amikor a kutató proteomikai kísérletek megtervezésén kezdi törni a fejét, sokszor elvesz a részletekben és a különféle tömegspektrometriás technikák dzsungelében. Milyen típusú analízist válasszak? Milyen tömegspektrométerrel érdemes elvégezni a vizsgálatokat? Szükségem lehet-e kvantitatív információra? Globális analízist vagy célzott vizsgálatot végezzek inkább? Fontos megjegyezzük, hogy bár egyre több különféle tömegspektrometriás analízisre van lehetőség, abszolút tökéletes és minden kérdésre választ adó módszer nem létezik. Mindegyik módszernek megvan az előnye és a hátránya, ezek alapos mérlegelése után kell kiválasztanunk a számunkra legmegfelelőbb technikát. Az első és legfontosabb dolog magunkban tisztázni, hogy mit is akarunk elérni a tömegspektrometriás vizsgálatokkal, milyen jellegű információra van szükségünk. Talán konkrétan ki is jelenthetjük, hogy a megfelelő kérdésfeltevés a kulcsa a kísérleti tervünk összeállításának; hiszen ha már az elején rosszul tesszük fel a kérdést, akkor nem biztos, hogy a megfelelő módszert választjuk ki. Bár bizonyosan eredményekhez fogunk jutni, semmi nem garantálja, hogy a számunkra lényeges információt megtaláljuk az eredmények között. Ebben a fejezetben bemutatjuk a proteomikai vizsgálatok során leggyakrabban alkalmazott tömegspektrometriás adatgyűjtési módok működési elvét, előnyeit és hátrányait, valamint útmutatást adunk arra vonatkozóan, hogy mikor célszerű és mikor nem célszerű az adott technikát választanunk.

Az egyes tömegspektrometriás adatgyűjtési technikákat két nagy csoportba sorolhatjuk annak alapján, hogy egy általános globális analízist szeretnénk végezni, vagy pedig valamilyen előzetes ismeretünk alapján kiválasztott fehérjé(ke)t szeretnénk vizsgálni. Az úgynevezett *shotgun* tömegspektrometriás eljárások segítségével ismeretlen minták globális analízisére van lehetőségünk nem irányított módon, míg célzott vizsgálatokkal specifikusan egy vagy több, előre meghatározott fehérjét vizsgálhatunk.

### Shotgun tömegspektrometriás technikák

A shotgun proteomikai vizsgálatok során egyik leggyakrabban használt adatgyűjtési mód az úgynevezett **adat/információ-függő adatgyűjtés (data/information-dependent acquisition, DDA/ IDA)**. Ezen módszer segítségével a fehérjék szekvencia alapú azonosítása mára már rutinszerűvé vált. Egy DDA kísérlet során a tömegspektrométer ciklusokban dolgozik. Minden ciklus elején egy pásztázó MS analízist végzünk annak érdekében, hogy megtudjuk, milyen  $m/z$  értékű peptidek eluálódtak le a kromatográfiás oszlopról. Ezután a tömegspektrométer típusától, gyorsaságától és felbontásától függően kiválasztjuk azt a 2–15 legintenzívebb csúcsot adó peptidet (prekursor ionokat), melyeknek meghatározzuk a töltésszámát. A töltésszám meghatározása a megfelelő fragmentációs energia kiszámolása miatt fontos, ugyanis a tömegspektrométereket vezérlő szoftverek a molekula  $m/z$  értéke és töltésszáma alapján kiszámolják a megfelelő fragmentációs energiát. Ezután a kiválasztott peptideket a kiszámolt energiamennyiséggel fragmentáljuk, majd a fragmens ionok begyűj-

tésével regisztráljuk az MS/MS spektrumokat. Azokat a prekursor ionokat, melyekről az adott ciklusban már készült MS/MS spektrum kizárási listába helyezzük, majd a ciklus előlről kezdődik és egészen a kromatográfiás elválasztás végéig ismétlődik (6.1. ábra).





formációhoz is hozzájuthatunk (lásd 8. fejezet). A módszer legfőbb hátránya, hogy mivel a prekursor ionok az intenzitásuk alapján kerülnek kiválasztásra, egy olyan hibát viszünk be az adatgyűjtésbe, amely az érzékenységet és a reprodukálhatóságot rontja. Egy általános adatfüggő adatgyűjtési kísérlet reprodukálhatósága 70% körül mozog, mivel ismételt injektlások során nem mindig ugyanazok a prekursor ionok kerülnek kiválasztásra, ezáltal az azonosított fehérjék számában is különbségek adódnak. Problémát jelent továbbá a nagy mennyiségben jelen lévő abundáns fehérjék jelenléte. Az ezen fehérjékből származó peptidok minden valószínűség szerint kiválasztásra kerülnek és MS/MS spektrumok fognak készülni róluk, így az alacsonyabb koncentrációban lévő fehérjék peptidjeiről nem biztos, hogy sikerül MS/MS spektrumot regisztrálnunk. Az abundáns fehérjék, mint például az albumin és különféle immunglobulin variánsok az esetek többségében nem relevánsak a kísérleti rendszerünk szempontjából. Emellett a technika érzékeny a nagyobb mennyiségben jelen lévő szennyezőkre, mint például a keratinra is.

### Előnyök:

- előzetes információk nélkül vizsgálhatjuk a mintákat,
- fehérje azonosításra az egyik leggyakrabban használt módszer,
- kvantitálási lehetőség.

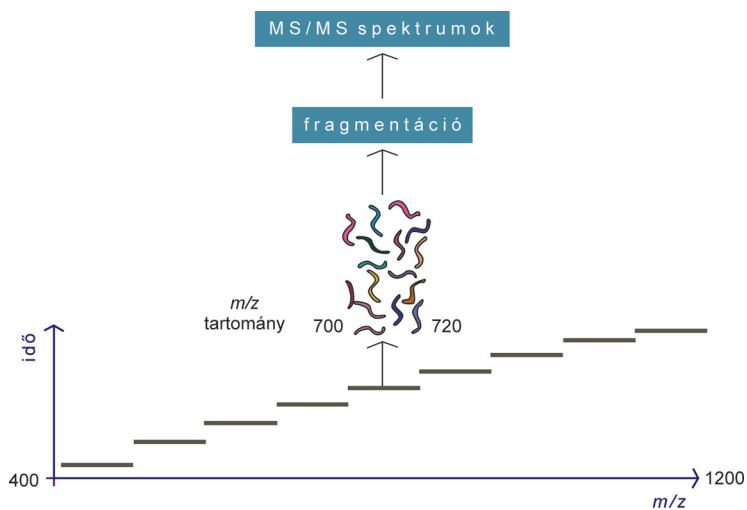
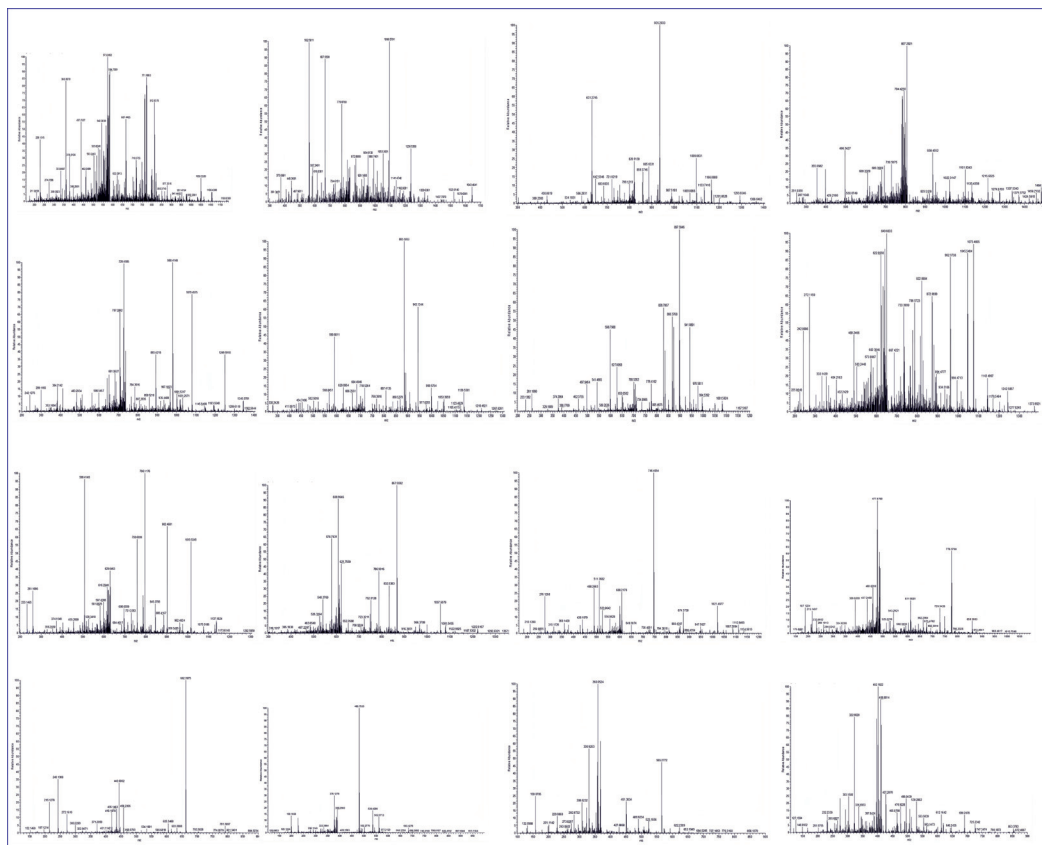
### Hátrányok:

- intenzitás alapján választjuk ki a prekursor ionokat, így hiányzó adatpontok keletkeznek, ami rossz reprodukálhatósághoz vezet,
- korlátozott érzékenység,
- nagy mennyiségben levő (abundáns) fehérjék azonosítása, melyek sok esetben nem relevánsak a kísérletünk szempontjából,
- az abundáns fehérjék között több esetben megjelennek a minta-előkészítés során bekeverülő szennyezők, mint például a különböző keratinformák.

Az adatfüggő adatgyűjtés legnagyobb hátrányára kínál megoldást az úgynevezett **adatfüggetlen adatgyűjtés (data-independent acquisition, DIA)**. Egy DIA analízis során nem történik prekursor ion kiválasztás, így nem vesszük be ezt a hibát a kísérleti rendszerbe, hanem minden jelen lévő prekursor ion kiválasztásra kerül, és MS/MS spektrum készül belőlük. A módszer során előre megadott, tág  $m/z$  tartományú tömegablakok monitorozása történik, így minden olyan ion kiválasztásra kerül, melyek  $m/z$  értékük alapján beleesnek az adott tömegablakba. A teljes vizsgálandó tartományt általában 6-10 tömegablakra oszthatjuk fel, így szekvenciálisan a teljes vizsgálandó  $m/z$  tartományt képesek vagyunk tanulmányozni (6.2. ábra).

A legtöbb DIA analízishez elengedhetetlen a nagy felbontás, gyorsaság és jó reprodukálhatóság, emiatt főként az Orbitrap analizátorral rendelkező tömegspektrométerek képesek ilyen analízisek elvégzésére. A TOF analizátorral rendelkező készülékek a DIA technika egy fajtáját, az úgynevezett SWATH-MS (*Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra*) technikát alkalmazzák. Természetesen, mivel több prekursor ion különféle fragmens ionjait tartalmazó spektrumokat regisztrálunk, egy DIA spektrum sokkal komplexebb, mint egy klasszikus DDA spektrum. Éppen ezért egy DIA spektrum értékelése speciális szoftvereket igényel, amelyek javarészt a szekvencia adatbázisok helyett spektrum könyvtárakat használnak az adatelemzéshez. Spektrum könyvtárakat létrehozhatunk DDA mérési adatok eredményeiből, illetve publikusan elérhető spektrum könyvtárak is használhatók.

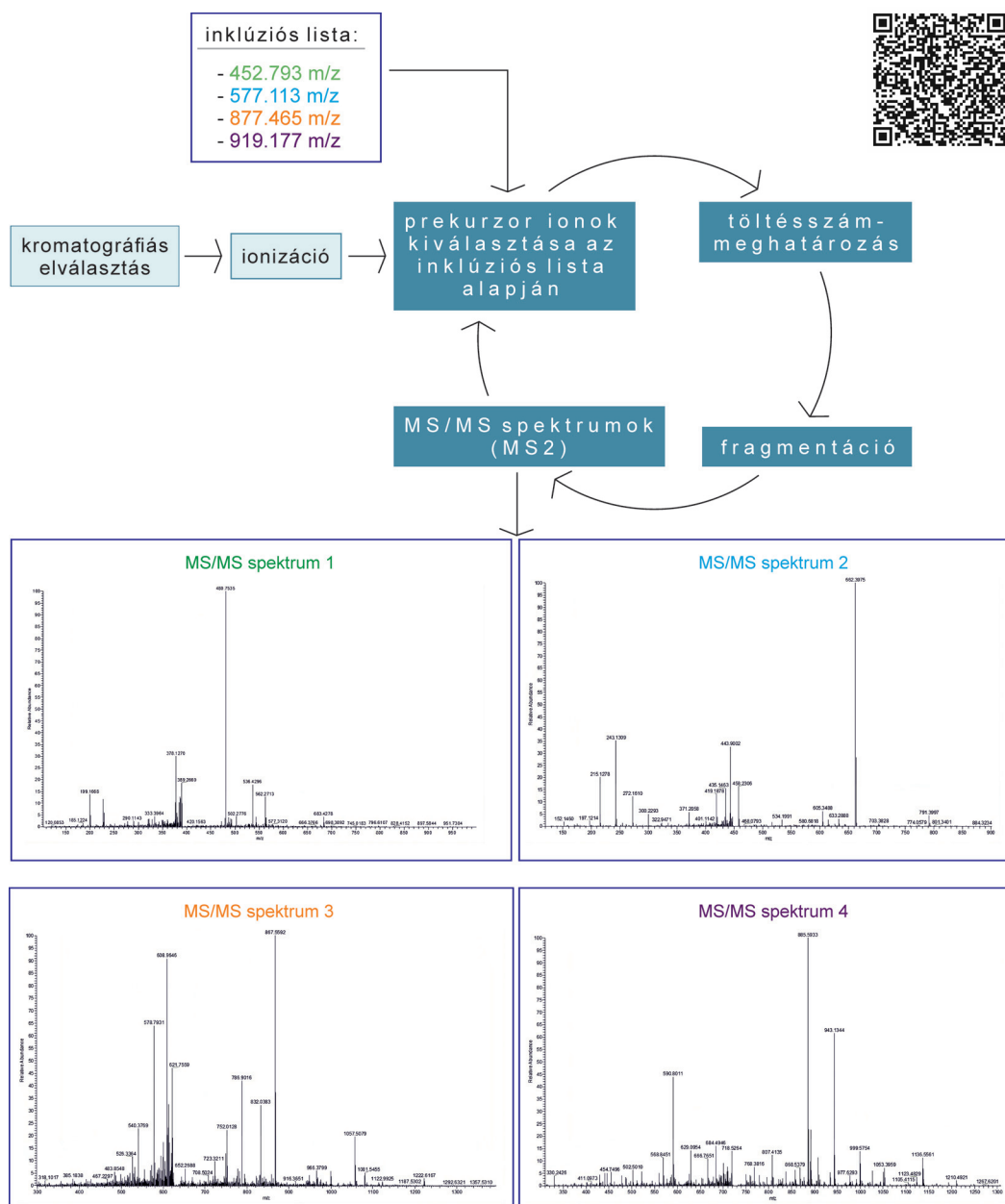




**6.2. ábra.** Adatfüggetlen adatgyűjtés (data-independent acquisition, DIA)



A technika nagy előnye, hogy a kis mennyiségben jelen lévő fehérjékről is információt nyerhetünk, valamint egy DDA analízishez képest sokkal jobb reprodukálhatósággal rendelkezik. A módszer nemcsak fehérjék azonosítására, hanem kvantitatív vizsgálatokra is egyaránt alkalmas (lásd 8. fejezet). A DIA elemzések megjelenése és elterjedése lehetővé tette a digitális proteomok létrehozását. A DIA adatok különféle publikus adatbázisokban történő tárolása lehetővé teszi, hogy egyrészt a vizsgált rendszer teljes proteomjáról információ álljon rendelkezésre.



6.3. ábra. Irányított adatgyűjtési technika

kezésre, másrészt arra is lehetőség van, hogy akár évekkel később újra elemezhesük a korábban regisztrált spektrumokat. Így ha egy projekt során új kérdések merülnek fel, nem szükséges a minták újra elemzése, elegendő visszakeresnünk a már regisztrált adatokat és az új kérdés fényében újra elemezhetjük az eredményeket.

### Előnyök:

- DDA/IDA módszerhez képest kevesebb hiányzó adatpont, ezáltal jobb reprodukálhatóság,
- nagy érzékenység,
- kvantitálási lehetőség,
- retrospektív adatelemzési lehetőség.

### Hátrányok:

- csak az erre a célra is alkalmas tömegspektrométereken használható,
- adatelemzéshez speciális szoftvereket igényel.

A DDA kísérletek egy módosított formáját képviseli az úgynevezett **irányított (directed) analízis**. Ennek során úgynevezett inklúziós listákkal dolgozunk, amelybe olyan peptidek kerülnek a módszerfejlesztés során, melyekről MS/MS spektrumot kívánunk felvenni. A tömegspektrometriás analízis előtt meghatározunk bizonyos prekursor ionokat, melyekről MS/MS spektrumot szeretnénk regisztrálni (**6.3. ábra**).

Az inklúziós listát általában korábbi DDA kísérletek eredményei alapján vagy bioinformatikai analízisek után tudjuk összeállítani. Ezzel a technikával információt szerezhetünk az általunk fontosnak tartott peptidekről.

### Előnyök:

- specifikus információt nyújt.

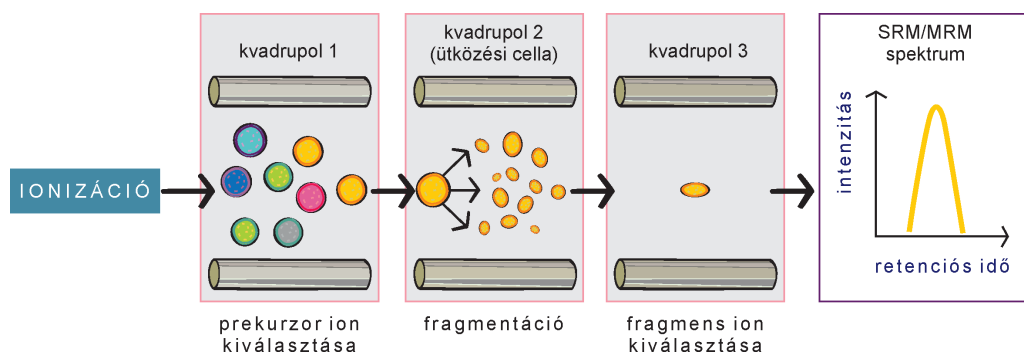
### Hátrányok:

- csak az inklúziós listában szereplő peptidekről nyújt információt.

## Célzott tömegspektrometriás technikák

A célzott tömegspektrometriás módszerek képviselik az érem másik oldalát. Bizonyos esetekben pontosan tudjuk, hogy milyen fehérjét/fehérjéket keresünk a vizsgálandó mintákban, és csak ezen fehérjékre kívánunk fókuszálni. Célzott módszerek alkalmazása során olyan peptideket vizsgálunk, melyek csak az általunk vizsgálni kívánt fehérjére specifikusak, így első lépésként meg kell határozzuk a vizsgálandó szekvenciákat. Ezek az úgynevezett *proteotipikus peptidek*, melyek specifikusak a vizsgálandó fehérjékre, emellett jól ionizálódnak és megfelelően fragmentálódnak a tömegspektrometriás elemzés során. A célzott tömegspektrometriás technikákat két fő módszer képviseli, az úgynevezett **Selected vagy Multiple Reaction Monitoring (SRM/MRM)** és a **Parallel Reaction Monitoring (PRM)**.

Az SRM/MRM a proteomikai kutatások egyik leggyakrabban alkalmazott célzott tömegspektrometriás módszere, mely a három kvadrupóllal rendelkező tömegspektrométerek egy speciális működési módja. Az első kvadrupól csak egy előre meghatározott prekursor ionot enged bejutni a második kvadrupólba, ami ütközési cellaként szolgál. A képződött fragmens ionok közül a harmadik kvadrupól csak egy előre meghatározott fragmens iont enged át a detektorba, így a tömegspektrométer csak a kiválasztott prekursor ion és a hozzá tartozó kívá-

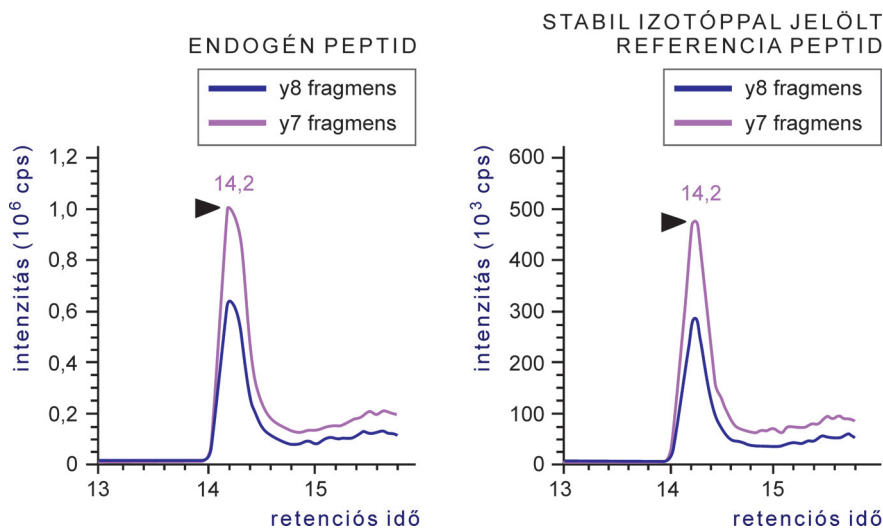


**6.4. ábra.** Selected/Multiple Reaction Monitoring (SRM/MRM) elve

lasztott fragmens ion együttes jelenléte esetén regisztrál jelet (6.4. ábra). A specifikus prekursor ion–fragmens ion párhoz tartozó  $m/z$  értékeket SRM/MRM átmenetnek nevezzük.

A módszer a peptid/fehérjék specifikus azonosítása mellett kvantitálásra is kiválóan használható (lásd 8. fejezet). Az SRM/MRM módszer specifikusságának további biztosítását szolgálja a stabil izotóppal jelölt szintetikus referencia peptidok használata az elemzések során. A referencia peptidok szekvenciája megegyezik a vizsgálni kívánt peptid szekvenciájával, így fizikokémiai tulajdonságai (ionizáció határfoka, retenciós idő, fragmentációs mintázat) megegyeznek. Azonban a tömegkülönbség miatt képesek vagyunk a referencia peptidet is monitorozni a neki megfelelő átmenetek beállításával (6.5. ábra). Így ezek a referencia peptidok belső standardként használhatók.

Egy SRM/MRM analízis során a tömegspektrométer több száz átmenet egyidejű vizsgálatára képes, ezáltal több fehérje vizsgálatára is alkalmas ugyanazon mintából. Bár az antitest alapú módszerek nagyobb érzékenységet biztosítanak, az SRM/MRM mérési módszerek tágabb dinamikus tartománnyal rendelkeznek. Az SRM/MRM módszer érzékenységét különféle dúsítási technikák segítségével növelhetjük. A specifitás, az érzékenység, a tág dynami-



**6.5. ábra.** Egy endogén peptid és stabil izotóppal jelölt szintetikus peptid párjának SRM/MRM spektruma

kus tartomány és a multiplex jelleg miatt az SRM/MRM módszer kiválóan alkalmazható fehérjék kvantitatív vizsgálatára kis mennyiségben rendelkezésre álló mintákban (lásd 8. fejezet). Mivel az SRM/MRM analízishez előzetes információra van szükség a vizsgálandó fehérjéről, a módszer fő hátránya, hogy a fehérje specifikus proteotipikus peptidek nem mindig állnak rendelkezésre. Emellett fontos megjegyezni, hogy a módszerfejlesztés és optimalizálás sokszor hosszadalmasnak bizonyulhat, mivel előzetesen optimalizálnunk kell minden paramétert, hogy a beállított átmeneteket megfelelően tudjuk monitorozni.

### Előnyök:

- nagy érzékenység,
- jó reprodukálhatóság,
- kvantitálási lehetőség,
- a célfehérjére fókuszál,
- multiplex jelleg.

### Hátrányok:

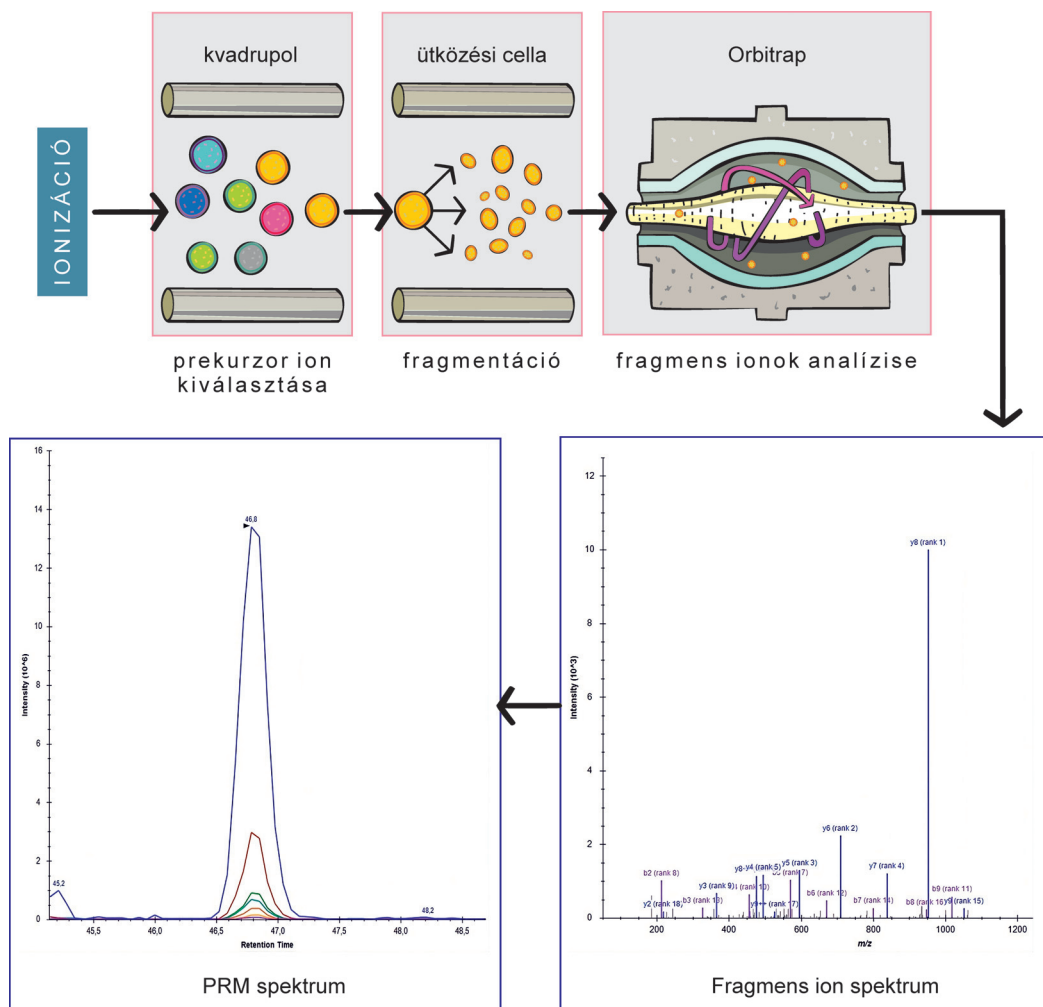
- sokszor hosszadalmas módszerfejlesztés és optimalizálás,
- proteotipikus peptidek nem mindig állnak rendelkezésre,
- a stabil izotóppal jelölt referencia peptidek beszerzése költséges.

Az SRM/MRM módszer tervezés legelső lépése a célfehérjék kiválasztása, majd a proteotipikus peptidek kiválasztása. A proteotipikus peptidek kiválasztása történhet kísérletes úton, melynek során a célfehérje emésztése után több MS analízis eredményéből kiválasztjuk azokat a peptideket, melyek megfelelően ionizálódtak, fragmentálódtak és az azonosításuk reprodukálható módon történt. Az így kiválasztott peptidek specifikusságát szekvenciaillesztéssel, például BLAST kereséssel (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) ellenőrizzük, majd a fragmentációs paraméterek optimalizálása után kiválasztjuk azt a néhány fragmenst, amelyeket az SRM/MRM módszerfájlba integrálunk. A kísérletes megközelítés mellett segítségünkre lehetnek az egyes adatbázisok, mint például a PeptideAtlas (<http://www.peptideatlas.org>), ahol információt gyűjthetünk arról, hogy az általunk vizsgálni kívánt fehérjét milyen peptidekkel azonosították korábbi tömegspektrometriás analízisek során. Emellett elérhetők olyan adatbázisok is, ahol a peptidek SRM/MRM mérési paramétere is rendelkezésre állnak. Ilyen adatbázis például az SRMAtlas (<http://www.srmatlas.org>) vagy a CPTAC Assay Portal (<https://proteomics.cancer.gov/assay-portal>), ahol validált célzott tömegspektrometriás módszerek is elérhetők az egyes proteotipikus peptidekre. Előfordulhatnak olyan esetek is, ahol nem áll rendelkezésünkre tisztított fehérje a kísérletes megközelítéshez, valamint az adatbázisokban sem találunk információt a keresett fehérjéről. Ezen esetekben különféle jóslásokat végezhetünk a fehérjeszekvencia alapján. *In silico* proteázhasítással ([https://web.expasy.org/peptide\\_cutter](https://web.expasy.org/peptide_cutter)) meghatározhatjuk a fehérjéből keletkező peptideket, amelyekből különféle prediktáló szoftverek, mint például a PREGO szoftver (<http://prego.maccoss.com>) segítségével megjósolhatjuk, hogy mely peptidek fognak megfelelően viselkedni a tömegspektrometriás analízis során. Nagyon fontos, hogy minden esetben ellenőrizzük a kiválasztott peptidek specifikusságát.

A hosszadalmas módszerfejlesztés kiküszöbölésére kínál lehetőséget a **PRM technika**, amely egyes modernebb nagy felbontású hibrid készülékekre (például kvadrupól-Orbitrap) jellemző mérési módszer. Az analízis során egy vagy több előre meghatározott anyai ion képes csak átjutni a kvadrupólra, azonban ütközés indukálta disszociáció után minden egyes

keletkezett fragmens ion regisztrálásra kerül a nagy felbontással működő második analizátorban (6.6. ábra).

Az SRM/MRM-hez képest a PRM nagy előnye, hogy az átmenetek kiválasztása az analízis elvégzése után, az adatelemzés során történik. Így egy PRM módszer létrehozása sokkal kevesebb időt vesz igénybe, mivel nincs szükség az átmenetek előzetes optimalizálására. Mivel minden képződő fragmens ion regisztrálásra kerül, az általunk megfelelőnek tartott átmenetek kiválasztása után lehetőség van a vizsgált peptidek specifikus azonosítására, valamint kvantitatív vizsgálatokra is (lásd 8. fejezet). Egy PRM analízis során a stabil izotóppal jelölt referencia peptidek használata bár ajánlott, de nem minden esetben szükséges, mivel a regisztrált fragmens ion spektrumból meg tudjuk határozni a peptid szekvenciáját, ezáltal biztosítva a módszer specifikusságát. A PRM módszer az SRM/MRM-hez képest nagyobb szelektivitással és specifitással rendelkezik, a nagy érzékenységgé és felbontású Orbitrap analizátor használata miatt. Emellett az SRM/MRM-hez viszonyítva nagyobb érzékenységgel rendelkezik, valamint a megbízhatósága is nagyobb a több fragmens ion regisztrálása miatt.



6.6. ábra. Parallel Reaction Monitoring (PRM)

**Előnyök:**

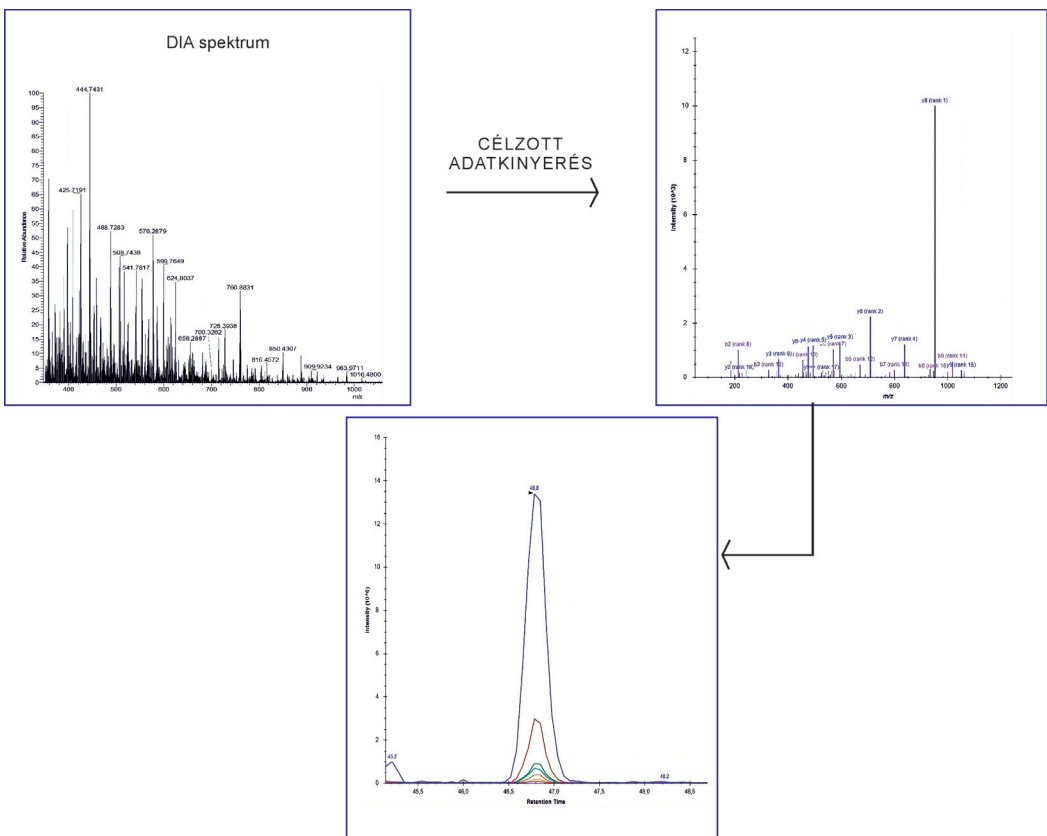
- jó reprodukálhatóság,
- SRM/MRM-hez képest nagyobb érzékenység,
- kvantitálási lehetőség,
- SRM/MRM-hez képest gyorsabb módszerfejlesztés,
- stabil izotóppal jelölt referencia peptidek elhagyhatók.

**Hátrányok:**

- proteotipikus peptidek limitált elérhetősége,
- nagy felbontású analizátorral rendelkező tandem tömegspektrométeren használható.

**Célzott adatfeldolgozás**

Bizonyos esetekben egy DIA analízis eredményéből is képesek vagyunk célzott technikához hasonló adatok kinyerésére. Mivel egy DIA kísérlet során elméletileg minden prekursor ion minden képződött fragmens ionjáról információval rendelkezünk, így ki tudjuk nyerni az egyes, általunk fontosnak tartott peptidekről a képződött anya ion–fragmens ion párokat, ezáltal SRM/PRM spektrumokat generálhatunk. Így módon egy alapvetően shotgun technika eredményeit felhasználva is képesek vagyunk specifikus, célzott adatokhoz jutni (6.7. ábra).





A fentiek alapján talán már érzékelhető az olvasó számára, hogy a shotgun és célzott tömegspektrometriás technikák ugyanazon érem két oldalát képviselik teljesen más előnyökkel és hátrányokkal. Fontos megjegyezni, hogy ezen technikák egymás kiegészítéseként működnek, nem érdemes közöttük fontossági sorrendet felállítani. Proteomikai vizsgálatok során, ha egy globális pásztázó analízist szeretnénk végezni, akkor első lépésként valamilyen shotgun analízist végzünk. A shotgun analízis eredményeinek megerősítésére, validálására és a kísérleteink továbbvitelére pedig a célzott technikák kiválóan alkalmazhatók.

### Ajánlott irodalom

1. Domon B, Aebersold R. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. *Nat Biotechnol.* 2010; 28(7):710-21.
2. Lange V, Picotti P, Domon B, et al. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol.* 2008; 4:222.
3. Bourmaud A, Gallien S, Domon B. Parallel reaction monitoring using quadrupole-Orbitrap mass spectrometer: Principle and applications. *Proteomics.* 2016; 16(15-16):2146-59.
4. Ludwig C, Gillet L, Rosenberger G, et al. Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol.* 2018; 14(8):e8126.
5. Gillet LC, Navarro P, Tate S, et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics.* 2012; 11(6):O111.016717.
6. Picotti P, Aebersold R. Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat Methods.* 2012; 9(6):555-66.
7. Cañas B, López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, et al. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2006; 4(4):295-320.

## 7. FEHÉRJEAZONOSÍTÁS MS/MS SPEKTRUMOK ALAPJÁN

Klement Éva,  
Hunyadi-Gulyás Éva,  
Darula Zsuzsanna

A fehérjék, fehérjekomplexek azonosítása során a mintában jelen lévő fehérjéket jellemzően nem egészben vizsgáljuk, hanem kisebb részekre szabdaljuk enzimatis vagy kémiai hasítással (lásd 3. fejezet), majd az így létrejövő peptidek MS/MS spektrumokból történő azonosítása révén igazoljuk az egyes fehérjék jelenlétét a mintában. Ugyanígy az MS/MS spektrumok alapján igazolhatjuk adott fehérjében adott aminosav-oldalláncon adott poszt-transzlációs módosítás előfordulását. Egy fehérje szekvenciájának hiányában pedig az MS/MS spektrumokból lehet azt *de novo* feltérképezni.

A peptidek MS/MS spektrumokból történő azonosítása a peptidet alkotó aminosavak és azok sorrendjének meghatározását jelenti. Az MS/MS jelölés arra utal, hogy egymás után két tömeg/töltés ( $m/z$ ) szerinti elválasztás történik: először megmérjük az intakt peptid (prekurzor)  $m/z$  értékét, az alapján izoláljuk, majd megfelelő módon gerjesztve a peptidet az szétesik több darabra és második lépésben az így képződő fragmensek  $m/z$  értékét mérjük meg (lásd 5. fejezet, *tandem tömegspektrometria*). A peptidek fragmentációja meghatározott módon, elsősorban a peptidgerinc mentén történik, az aktiválási módtól függően az amidkötések vagy az amidkötésben lévő nitrogén és az  $\alpha$ -szén közötti kötések hasadnak el. Ez a szabályszerű fragmentáció teszi lehetővé a peptidet alkotó aminosavak sorrendjének meghatározását, akár adatbázisban történő lekereséssel, akár *de novo* szekvenálással.

### Peptidek fragmentációja, aktiválási módok

A fragmentációs folyamat első lépése a prekursor ion kiválasztása, ami jellemzően kvadrupól szűrővel vagy ioncsapdában történik. Kvadrupól szűrő esetén az elektródokon alkalmazott elektromos erőterrel tudjuk szabályozni, hogy csak adott  $m/z$  értékkel rendelkező ionok haladjanak át az elektródok között, míg ioncsapda esetén a megfelelő  $m/z$  értékkel rendelkező ionok kiválasztása úgy történik, hogy az elektródokra kapcsolt megfelelő feszültségek alkalmazásával az összes becsapdázott ion közül minden mást kisöprünk és csak a megfelelő  $m/z$  értékkel rendelkezők maradnak benn az ioncsapdában.

**7.1. táblázat. A fehérjeanalízisben leggyakrabban alkalmazott aktiválási módok és a keletkező peptidfragmensek áttekintése**

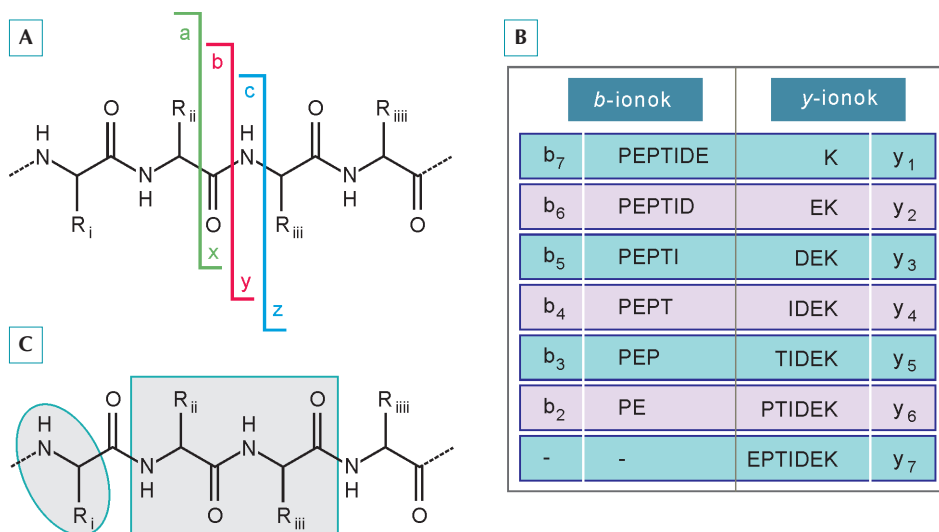
Aktiválás módja	Fragmentáció	Keletkező ionok	Készülék típus
Rezonanciagerjesztés és ütközés inert gázzal (He)	CID	$a$ -, $b$ -, $y$ -ionok	ioncsapda
Gyorsító feszültség és ütközés inert gázzal ( $N_2$ , Ar)	CID	$a$ -, $b$ -, $y$ -, immónium-, belső ionok	ütközési cellával rendelkező készülékek (Q-TOF, Q3, Orbitrap hibrid készülékek)
Elektronnyaláb	ECD	$c$ -, $z'$ -ionok	FT-ICR
Ütközés gyök anionnal (fluorantén, 1,4-dicianobenzol)	ETD	$c$ -, $z'$ -ionok	ETD forrással rendelkező készülékek (Orbitrap hibrid készülékek, Triwave-Q-TOF)

A megfelelő ionok kiválasztása után a következő lépés az ionok aktiválása. Ez többféleképpen történhet: elektromos erőterben történő felgyorsítást vagy rezonanciagerjesztést követően atomokkal, semleges molekulákkal, ionokkal való ütközés révén vagy elektronbefogással (7.1 táblázat).

Az ioncsapdában kiválasztott ionokat rendszerint az  $m/z$  értéküknek megfelelő rezonanciagerjesztéssel aktiválják, aminek hatására az ionok kinetikus energiája megnő, és a csapdát kitöltő hélium gázzal való ütközés hatására elhasadnak (CID, *collision-induced dissociation*, ütközés hatására bekövetkező hasadás). Mivel itt a gerjesztés célzottan a prekursorra hat (az  $m/z$  értékének megfelelően), ilyenkor csak egyszeres kötéshasadás történik a peptid egyik amidkötése mentén, a képződő fragmensek további hasadása nem jellemző. Az ioncsapda CID jellegzetessége még, hogy a prekursor  $m/z$  értékének  $1/3$ -a alatti fragmenseket elvesztjük.

A prekursor ion aktiválására további lehetőség, ha a kiválasztott iont gyorsítófeszültség alkalmazása mellett (így tesz szert plusz kinetikus energiára az ion) inert gázzal (argon, nitrogén) töltött ütközési cellán vezetjük át. Az így nyert CID spektrumok némiképp eltérnek az előbb ismertetett ioncsapda CID-tól, mivel ebben az esetben a prekursor aktiválása során képződő fragmensek tovább ütközve a cellát kitöltő gázzal ugyancsak fragmentálódhatnak, így többszörös kötéshasadás is történhet.

Szintén kötéshasadást lehet elérni, ha a prekursor ionok elektronnyalábbal találkoznak (ECD, *Electron-Capture Dissociation*, elektronbefogásos disszociáció) vagy anionokkal (fluorantén anion, 1,4-dicianobenzol) ütközve elektront vesznek át (ETD, *Electron-Transfer Dissociation*, elektrontranszfer disszociáció). Ez utóbbi két aktiválási mód kevésbé hatékony, általában a nagyobb töltésű és nagyobb töltéssűrűségű ( $z > 2$ ,  $m/z < 850$ ) ionokra működik



**7.1. ábra.** Peptidek fragmentációja. A: Egyszeres kötéshasadással *N*-terminálisra eső *a*-, *b*- és *c*-ionok, valamint *C*-terminálisra eső *x*-, *y*- és *z*-ionok képződhetnek, aktiválástól függően. B: A 'PEPTIDEK' szekvencia szematikus fragmentációja ütközéses aktiválásra. Az alsó index azt jelöli, hogy *a*-, *b*- és *c*-ionok esetén az *N*-terminális, *x*-, *y*- és *z*-ionok esetén a *C*-terminális felől számolva hány aminosav található a fragmensben. C: Többszörös kötéshasadással *b*-típusú belső ionok (négyzetes háttér) és *a*-típusú immónium ionok (ovális háttér) keletkezhetnek. Az ábrán az aminosavakat az egybetűs rövidítésekkel jelöltük.

jobban. Alacsonyabb hatékonysága miatt az ETD aktiválást gyakran egészítik ki kisebb energiájú ütközéses aktiválással (ETciD/ETHcD).

A peptidek aktiválását követő lehetséges kötéshasadásokat, valamint a képződő fragmensek nevezéktanát a **7.1 ábra** szemlélteti.

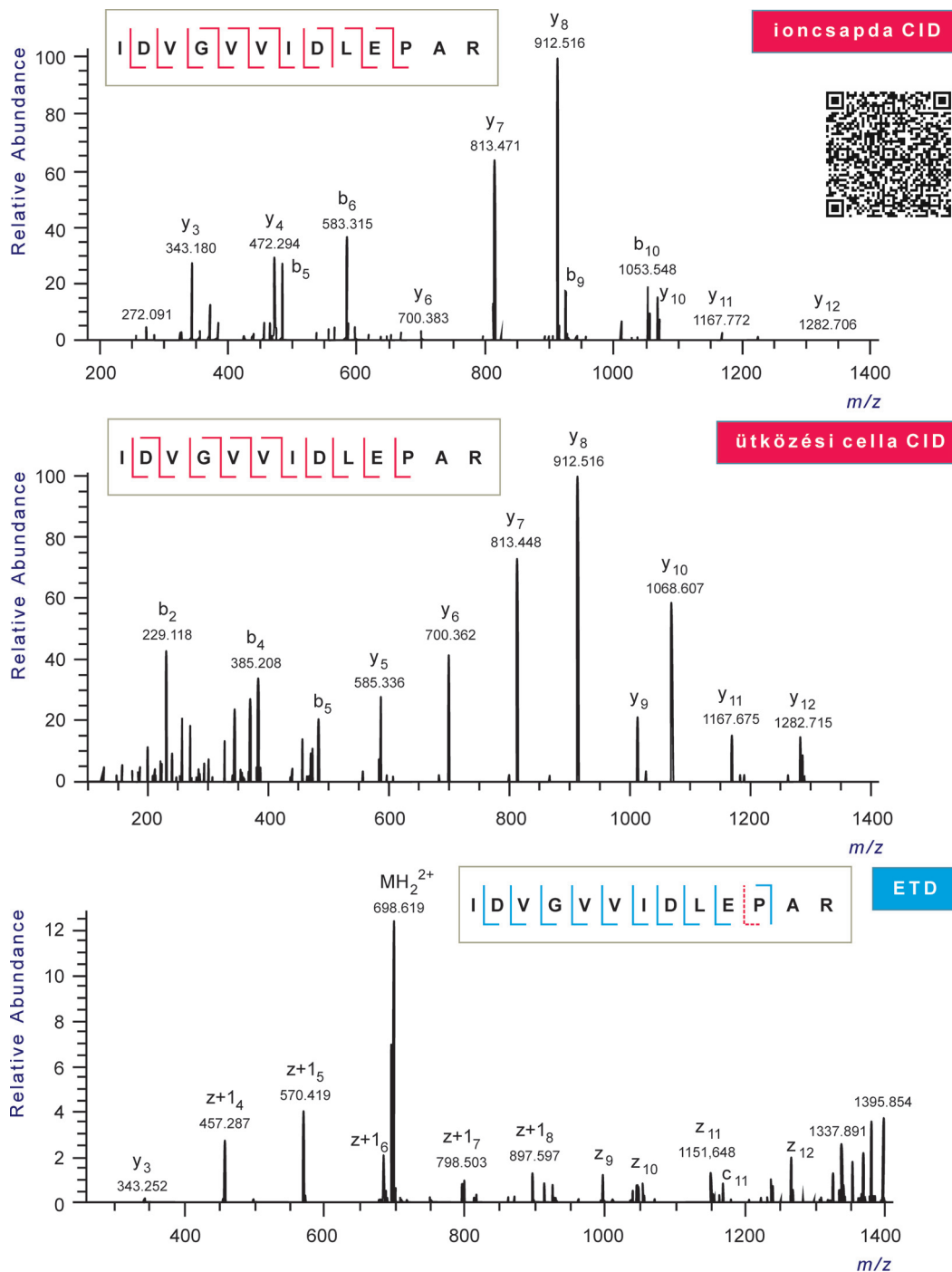
A tömegspektrométer csak töltött részecskékről ad információt, így attól függően detektálhatunk (egyszeres kötéshasadással) *N*-terminálisra eső *a*-, *b*- vagy *c*-ionokat és *C*-terminálisra eső *x*-, *y*- vagy *z*-ionokat, hogy a prekursor töltése hogyan oszlik meg az ionon belül és hogy hol hasad el a peptidlánc. A triptikus peptidek az ESI ionizáció (lásd 5. fejezet) során jellemzően legalább két töltést vesznek fel, amiből az egyik a peptid *N*-terminálisán lévő aminocsoportra, a másik pedig a *C*-terminálison található bázikus aminosavra (Lys, Arg) lokalizálható, így triptikus peptidek esetén egyaránt jól detektálhatunk *N*- és *C*-terminális fragmenseket is (**7.2 ábra**).

Az ioncsapdában történő rezonanciagerjesztés vagy az ütközési cellában történő aktiválás (CID) során az amidkötés hasad el. Az ioncsapdás CID esetén az egyszeres kötéshasadás következtében leginkább *b*- és *y*-ionokat detektálunk. Ezzel szemben az ütközési cellában a többszörös ütközések, és ennek következtében a többszörös kötéshasadások eredményeként a *b*- és *y*-ionok mellett belső fragmensek és a peptidet alkotó aminosavakról áruklódó immóniumionok is képződnek, utóbbiak megjelenése az aromás oldalláncú aminosavaknál kifejezett. Az amidkötés elhasadásából származó *b*- és *y*-ionokat kísérhetik még a spektrumokban további ionok, amelyek úgy keletkeznek, hogy egyes aminosavak oldallánca vizet vagy ammóniát veszít. Vízvesztés a hidroxilcsoportot tartalmazó és a savas aminosavakra (Ser, Thr, Asp, Glu) jellemző, míg ammóniát többnyire a bázikus vagy amidcsoportot tartalmazó aminosavak (Lys, Arg, Gln, Asn) veszítenek.

Az ütközési cellában felvett **CID spektrumokra** jellemző, hogy a többszörös ütközések során a *b* ionok könnyen tovább hasadnak, így ezekben az MS/MS spektrumokban főként *y*-ion sorozatot és néhány kisebb *N*-terminális fragmenst ( $b_2$ ,  $b_3$ ) detektálunk. Ugyanakkor  $b_1$ -ion nem képződik, kivéve akkor, ha a peptid az *N*-terminálison acilezett (például *in vivo* acetileződés a fehérje *N*-terminálisán vagy kvantitálásra használt izobár jelölés peptidek *N*-terminálisán, lásd 8. fejezet), ugyanis a képződő *b*-ion szerkezetét a hasadás helyétől az *N*-terminális felé eső szomszédos amidkötés stabilizálja gyűrűs oxazolón formában.

Elektronbefogásos vagy elektrontranszfer disszociáció (ECD, ETD) során az amidkötésben lévő nitrogén és az  $\alpha$ -szén közötti kötés hasad el, aminek következtében *c* és *z'*-(a pont az extra elektront, azaz a gyökiont jelzi) ionokat detektálunk a spektrumokban. Az ETD jellemzője, hogy elsősorban a peptidgerinc hasad el és az oldalláncok, valamint azok módosításai érintetlenül maradnak, aminek a módosítást hordozó peptidek analízisében van nagy jelentősége. Ha a hatékonyság javítása végett az ETD fragmenseket további ütközéses aktiválásnak vetjük alá (ETciD/ETHcD), egy vegyes fragmentációt kapunk, amiben továbbra is a *c*- és *z'*-ionok dominálnak, de megjelennek mellettük *b*- és *y*-ionok is, illetve az oldalláncok hasadását is megfigyelhetjük a spektrumokban.

Kétszer töltött prekursor ionok ETD fragmentációja során a *c*- és *z'*-ionok mellett gyakran detektálunk ezektől 1 Da-nal eltérő ionokat is ( $c-1$ ,  $z+1$ ), ami hidrogéntranszfer eredménye. Prolint tartalmazó peptidek esetén a prolinra eső hasadást az ETD spektrumokban nem detektáljuk külön fragmensként, mivel a prolin nitrogénje gyűrűbe van zárva, így a nitrogén és az  $\alpha$ -szén közötti hasadás után is egyben marad a lánc.



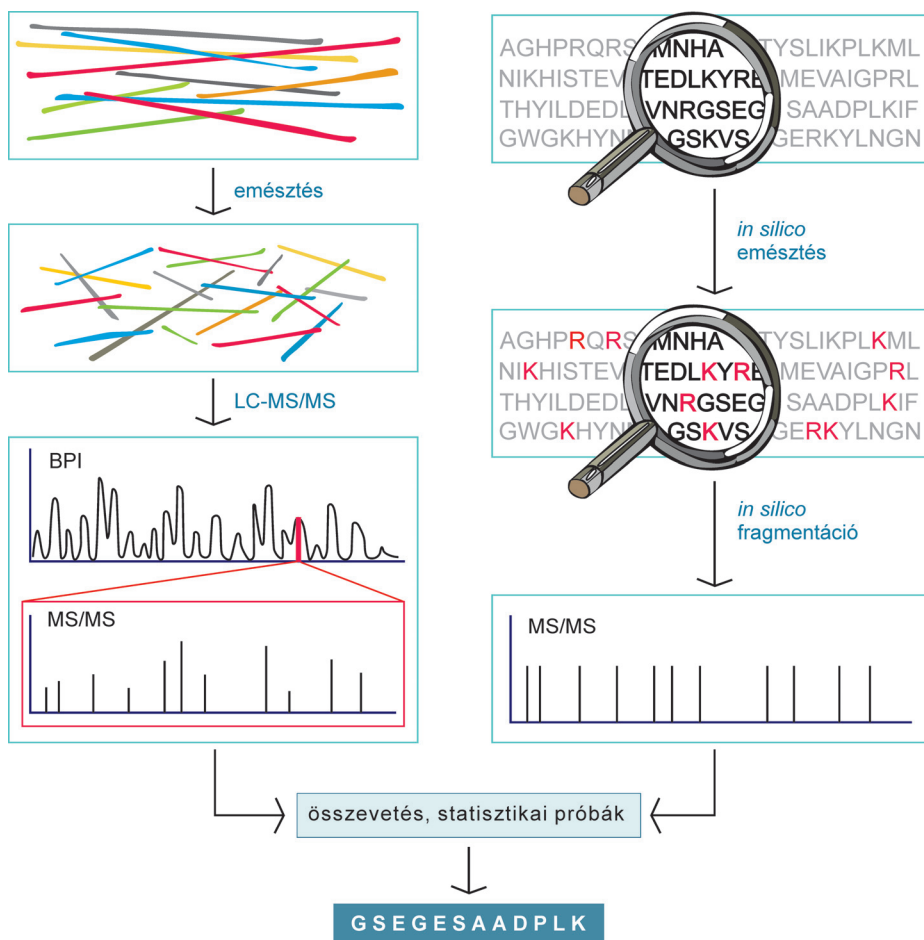
**7.2. ábra.** Az IDVGVIDLEPAR peptid MS/MS spektruma ütközéses aktiválásra (CID ioncsapdában és ütközési cellában), illetve elektrontranszfer disszociáció következtében (ETD). A fragmensek jelölése a 7.1. ábrának megfelelő. Az ETD-ben detektált  $y_3$ -ion (a szekenciában piros szaggatott vonallal jelölve) a kiegészítő aktiválás eredménye. Az ábrán az aminosavakat az egybetűs rövidítésekkel jelöltük.

### Fehérjék/peptidek azonosítása adatbázisban történő lekereséssel

A peptidek azonosítása az MS/MS spektrumokból adatbázis-lekereséssel történik: a mérés során felvett spektrumokat az adatbázisban található fehérjék *in silico* emésztésével és a lehetséges prekursorjelöltek *in silico* fragmentációjával nyert elméleti spektrumokkal vetjük össze (7.3. ábra).

A sikeres azonosításhoz tehát szükség van a mérés során detektált prekursor ion és a belőle képződő fragmensek pontos  $m/z$  értékére, a minta-előkészítési lépések és az adatgyűjtési mód pontos ismeretére, és arra is, hogy az adatbázisokban megtalálható vagy más módon hozzáférhető legyen a fehérje szekvenciája.

A mérés során nyert adathalmazt először csúcslistává alakítjuk, ami tartalmazza a prekursor ion és a belőle képződő fragmensek  $m/z$  értékét, intenzitását, valamint a töltését is,



**7.3. ábra.** Peptidek azonosítása adatbázis-lekereséssel. A minta-előkészítés során a fehérjéken bekövetkező változásokat (pl. emésztés, oldallánc-derivatizáció, kémiai jelölések), valamint a mérésnek megfelelő paramétereket *in silico* leképezzük az adatbázisban található fehérjeszekvenciákon, majd az így nyert elméleti adatok közül választjuk ki a mért adatokra leginkább illőt. Az ábrán az aminosavakat az egybetűs rövidítésekkel jelöltük.

amennyiben a felbontás ezt lehetővé teszi. Mivel a különböző aktiválási módokkal eltérő típusú fragmenseket nyerünk, a készülék fajtájának megadása fontos paraméter, hogy a lekereső szoftver a megfelelő fragmens ionokat vegye figyelembe. Egy peptid nem feltétlenül fragmentálódik minden kötésnél, illetve nem detektálunk minden fragmenst, arra adatbázis-lekeresésnél nincs is szükség, viszont minél teljesebb a fragmentáció és minél több fragmenst detektálunk, annál egyértelműbben azonosítható a peptid. Ugyanígy fontos paraméter, hogy az adatokat milyen pontossággal mérjük. Minél pontosabban mérjük a prekursor iont, annál kevesebb a lehetséges jelölt, és annál kisebb a valószínűsége, hogy egy találat a véletlen eredménye. Ily módon egy gyengébb MS/MS spektrumból (alacsonyabb jelintenzitás és jel/zaj viszony, gyéresebb fragmentáció vagy rövidebb szekvencia) is nagyobb eséllyel azonosítunk peptidet.

Csak azokat a fehérjéket tudjuk azonosítani adatbázis-lekereséssel, amelyek megtalálhatók a lekeresés során használt adatbázisban. A két legelterjedtebb, bárki számára elérhető adatbázis a Uniprot (SwissProt) és az NCBI adatbázisa (<https://www.uniprot.org/>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>), mindkettő számos faj ismert genomiális és fehérje-szekvenciáit tartalmazza, valamint a géntermékekkel és fehérjékkel kapcsolatban számos további információt is. Ezeken túlmenően egyéb, fajspecifikus adatbázisok is elérhetők és letölthetők, illetve saját szekvenciákat és adatbázisokat is felhasználhatunk a lekeresések során. Jellemzően fehérje-adatbázisokban végezzük a lekeresést, de lehetőség van nukleotid-szekvenciákra illeszteni a mért adatokat (a fehérjeszekvenciára való fordítást a lekereső szoftver elvégzi), vagy korábbi mért adatokból létrehozott spektrumkönyvtárakat használni. Ahogy az ismereteink bővülnek, úgy duzzadnak folyamatosan az adatbázisok, és ezzel párhuzamosan egyre bővül az egyes bejegyzések annotációja is. A megfelelő adatbázis kiválasztásakor érdemes megfontolni, hogy melyik az, amelyik az általunk vizsgált faj(ok)ra nézve a legteljesebb, ugyanakkor a legkevesebb felesleges bejegyzést tartalmazza. Ez az elv más paraméterekkel kapcsolatban is alkalmazandó. Bár a lekereső programok elég nagy szabadságot adnak a felhasználó számára a különböző keresési paraméterek kapcsán (pl. kihagyott hasítóhely, enzimspecifitás, a peptideken előforduló lehetséges módosítások fajtája és száma), bánjunk ezekkel takarékosan. Ha túl nagy varianciát engedünk meg a rendszernek, azzal a valós és véletlen találatok közötti határvonalat mossuk el, valamint jelentősen megnöveljük a keresési időt. Az észszerűen megválasztott paraméterekkel megbízhatóbb eredményeink lesznek.

Bármilyen komplex is a vizsgált minta és bármennyi MS/MS spektrumot gyűjtöttünk az analízis során, a peptidek azonosítása egyedileg, egymástól függetlenül történik, és csak ezt követően fogja a lekereső szoftver az egyedi peptidtalálatokat összerendezni, hogy az azonos fehérjéhez tartozó peptideket együtt listázza. Az azonosítás során azt a peptidet fogadjuk el a legvalószínűbb találatnak, amelyik a figyelembe vett paraméterek alapján a legjobban illeszkedik a mért adatokra, mindamellett kicsi annak a valószínűsége, hogy a találat a véletlen eredménye. Ezt különböző valószínűségi próbákkal lehet számítani. Ezen túlmenően további szűrőket is lehet alkalmazni, hogy mely peptid- és fehérjetalálatokat fogadjuk el. Az elfogadási határt meghúzhatjuk például egy adott pontszámnál. Komplex minták analízisének pedig a legáltalánosabb eljárás, hogy az adatok összességét egy véletlenszerű vagy fordított adatbázisban is lekeressük, és az elfogadási határt úgy húzzuk meg, hogy a fordított vagy random adatbázisból azonosított peptidek és/vagy fehérjék, tehát a biztosan téves találatok aránya 1% (vagy legfeljebb 5%) alatt legyen. Ezzel a módszerrel azt becsüljük meg, hogy mekkora lehet a véletlen találatok aránya a valódi adatbázisból (*FDR, false discovery rate*). A különböző lekereső szoftverek ugyan eltérő pontozást alkalmaznak az azonosítás során, és



különbség lehet abban is, hogy a spektrumokból mely csúcsokat és hogyan választják ki, azonban a megfelelő statisztikai ellenőrzésekkel hasonló eredményre kell jussanak, eltérés leginkább a gyengébb találatok között várható.

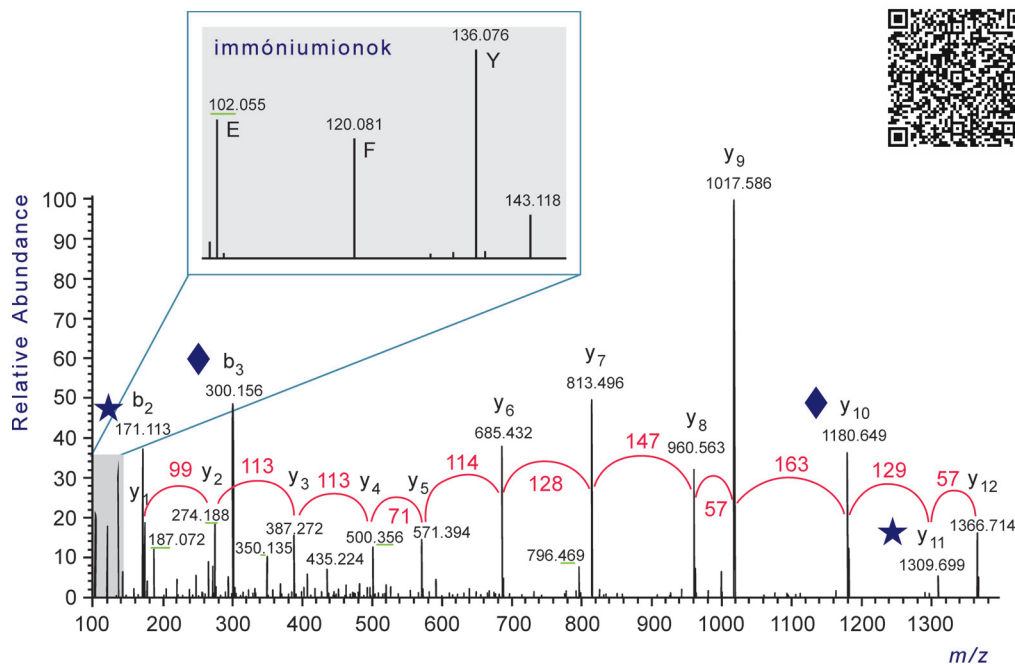
### De novo szekvenálás

Adatbázis hiányában lehetőség van arra is, hogy az MS/MS spektrumokból mi magunk olvassuk ki (esetleg szoftver segítségével) a keresett peptid szekvenciáját. Viszont amíg egy adatbázis-lekereséshez azok az MS/MS spektrumok is tökéletesen alkalmasak, amelyek csak részleges fragmentációt tartalmaznak, *de novo* szekvenáláshoz minden kötéshasadást detektálnunk szükséges, hogy a peptid szekvenciáját az elejétől a végéig kiolvashassuk. Erre legalkalmasabbak az ütközési cellás készülékekkel nyerhető CID spektrumok, aminek több oka is van. Egyrészt ez egy hatékony aktiválási mód, megfelelően beállított ütközési energiával a prekursor ionok nagy része elhasad. Másrészt ezek a spektrumok információgazdagabbak. Az ioncsapdás rezonancia-gerjesztéssel ellentétben, itt nem veszítjük el az alsóbb tömegtartományt, így a kisebb fragmenseket és a peptid aminosav-összetételéről árulkodó immóniumionokat is jól detektáljuk. Harmadrészt pedig, triptikus peptideknél az  $a_2$ - $b_2$  fragmensek mellett elsődlegesen az  $y$ -ionok sorozatát látjuk (a  $b$ -ionok könnyebben bomlanak a többszörös ütközések során), ami megkönnyíti a peptid szekvenciájának kiolvasását. További mankó lehet, hogy az összetartozó  $b$ - és  $y$ -ionok együttes tömege a prekursor ion plusz egy proton tömegét adja ki, és semleges veszteségeiből eldönthető, hogy melyik ion tartozik a  $b$  és melyik az  $y$  sorozathoz. Az ammónia- (-17 Da) vagy vízvesztés (-18 Da) egyaránt megfigyelhető  $b$ - és  $y$ -ionoknál is, viszont a 28 Da veszteség mindenképpen  $b$ -ionra vagy belső ionra utal. Sajnos, az ütközési cellában történő aktiválás során keletkező belső ionok a *de novo* szekvenálást akadályozhatják. Főleg prolintartalmú peptideknél lehet intenzívebb belső ionokra számítani. Ugyanakkor a *de novo* szekvenálást segíti, ha nemcsak a prekursor ion, de a fragmensek  $m/z$  értékét is izotópfelbontással és nagy pontossággal tudjuk mérni. Így egyrészt megállapítható, hogy az adott fragmens egyszeresen vagy többszörösen töltött-e. Másrészt pontos tömegméréssel az izobár glutamin és lizin aminosavak megkülönböztethetők (tömegkülönbségük 0,036 Da). Az izomer leucin és izoleucin megkülönböztetésére ezek a spektrumok sajnos nem alkalmasak, ahhoz egyéb fragmentációs technikákat kell segítségül hívni. Az Ile/Leu megkülönböztetésére az immóniumion ( $m/z$  86) további fragmentálása (MS3), az EThcD spektrumokban esetleg megjelenő  $w$ -ion ( $z'$ -ionból aminosav-oldallánc hasadásával keletkező termék) vagy a  $z'$ -ion további fragmentálása (MS3) ad lehetőséget. Az MS/MS spektrumokból történő *de novo* szekvenálás fent említett elemeit szemlélteti a **7.4 ábra**, a számolásokhoz segítséget a **7.2 táblázat** ad.

**7.2 táblázat.** Különböző fragmens ionok tömegének kiszámítása

Fragmens ion típusa	Fragmens ion tömege
$b$ -ion	$\Sigma$ gyöksúly + 1,0072
$a$ -ion	$\Sigma$ gyöksúly – 26,9877
$y$ -ion	$\Sigma$ gyöksúly + 19,0178
$b + y$ ion együttesen	protonált prekursor ion ( $MH^+$ ) + 1,0072
immóniumion	gyöksúly – 26,9877
belső ion	$\Sigma$ gyöksúly + 1,0072

Bár a manuális spektrumértelmezés kellő jártasság birtokában (a komplexebb megközelítés révén) jellemzően eredményesebb, a *de novo* szekvenálásra kifejlesztett szoftverek nagy mennyiségű adat feldolgozására mindenképpen előnyösek. Ezen túlmenően egyes adatbázis-lekereső algoritmusok hibrid módban működnek: a spektrumból *de novo* kiolvasott rövidebb szekvencia-darabkát is felhasználják a peptidazonosítás során. Ezzel a módszerrel egyrészt a lehetséges peptid-jelöltek száma és így a lekeresési idő csökkenthető, másrészt nem várt poszttranszlációs módosítások is felderíthetők.



**7.4. ábra.** *De novo* szekvenálás MS/MS spektrum alapján. A prekursor ionot kétszeres töltéssel detektáltuk,  $m/z=740,402$  Da. A fragmens ionok távolságából (pontos tömeg) kiolvasható a peptid szekvenciája (y-ion sorozat), az összetartozó b-y párokat azonos szimbólum jelöli. A detektált immónium ionok megerősítik a Glu, Phe és Tyr aminosavak jelenlétét a peptidben. Az izomer Ile-Leu megkülönböztetése nem lehetséges ebből az MS/MS spektrumból. A peptid szekvenciája: [I/L]GEYGFQNA[I/L][I/L]VR. Az ábrán az aminosavakat az egybetűs rövidítésekkel jelöltük.

### Poszttranszlációs módosítások azonosítása

A poszttranszlációs módosítások azonosítása és pontos helyének megállapítása szintén az MS/MS spektrumokból történik. Azon módosítások esetében, amelyek stabilak maradnak az ionizáció és a fragmentáció során, a módosításnak megfelelő tömegváltozást tapasztaljuk a prekursor ion és a módosítást hordozó fragmens ionok tömegében egyaránt. Ilyen módosítás többek között az aszparagin/glutamin deamidációja (+1 Da), a lizin oldalláncát érintő acetileződés (+42 Da) vagy metileződés (+14 Da). Vannak olyan módosítások is, amelyek az ionizáció során ugyan stabilak, így a prekursor ion tömege még őrzi az információt a módosításról, de a fragmentáció során nyom nélkül elvesznek. Ilyen módosítás például a szerin vagy treonin oldalláncán előforduló szulfatálás, ami ütközéses aktiválás vagy rezonanciager-

jesztés hatására teljesen lehasad és módosított fragmenszek egyáltalán nem detektálhatók. Egyes módosítások ennél cífrábban viselkednek. A metionin oldalláncán történő oxidáció a prekursor ion tömegét 16 Da-nal növeli meg, viszont az ütközéses aktiválás vagy rezonanciagerjesztés hatására C-S kötéshasadás történhet az oldalláncban, ami részleges 64 Da vesztésben jelentkezik a prekursor ion és a megfelelő fragmens ionok tömegében. Hasonlóan viselkedik a szerin/treonin oldalláncán előforduló foszfátészter: a prekursor ion tömege 80 Da-nal nő meg, ugyanakkor részleges 98 Da vesztést detektálunk a CID spektrumokban. A foszforilációról, valamint az N- és O-glikozilációról a későbbi fejezetekben részletesen is szó esik majd. Amint láthatjuk, a módosítások egyedi fragmentációja inkább az ütközéses aktiválás vagy rezonanciagerjesztés során figyelhető meg, ETD-ben a módosítások jellemzően sokkal stabilabbak, ami a módosítás helyének meghatározását nagyban segítheti.

Szerencsére az adatbázis-lekeresők az egyszerűbb módosítások jó részénél képesek kezelni a módosított peptidek fragmentációját, sokszor még azokban az esetekben is, amikor a módosítás sajátos módon hasad el. A nehézséget inkább az okozza, hogy a módosítások jellemzően szubsztöchiometrikusak, sokszor alig néhány százalékban fordulnak elő egy-egy fehérjén, egy-egy pozícióban. Így a poszttranszlációs módosításokkal változó módosításként kell számolnunk, azaz vagy rajta található egy adott aminosavon vagy sem. Szemléltetésképpen vegyük a metionin oxidációját, ami egy könnyen végbemenő reakció, nemcsak poszttranszlációs módosításként fordulhat elő a fehérjén, sokszor a minta-előkészítésnek és emésztésnek is a velejárója, ezért annak lehetséges előfordulását rendszerint figyelembe vesszük az adatbázis-lekeresés során. Így, ha egy peptidben csak egy metionin található, akkor a lekereső azzal a peptiddel kétszer számol: módosítatlanul és egyszeresen oxidálva. Ha viszont két metionin van a peptidben, akkor már négyszer veszi figyelembe: módosítatlanul, egyszeresen oxidálva egyik vagy másik metioninon, és kétszeresen oxidálva is. Ahogy nő a peptidben a módosítható aminosavak száma, főleg ha többféle változó módosítást is beállítunk, úgy nő exponenciálisan a figyelembe veendő szekvenciavariációk száma. Ahogy azt már fentebb is említettük, bánjunk a változó módosításokkal takarékosan, csak azokat a módosításokat vegyük figyelembe, amelyek a kísérleteink szempontjából lényegesek és szükségesek, illetve korlátozzuk az egy peptiden megengedett módosítások számát.

## Kísérlettervezés, gyakorlati szempontok

### ■ A megfelelő készülék és fragmentációs technika kiválasztása

Azt, hogy milyen készüléket, milyen fragmentációs technikát, milyen adatgyűjtési módot választunk, nagyban befolyásolja, hogy mi a kísérlet célja, mi a megválaszolandó kérdés. Tulajdonképpen ez határozza meg, hogy milyen típusú adatokra van szükségünk, mit és milyen pontossággal kell mérnünk. Fontos szempont továbbá, hogy mennyi vizsgálandó anyag áll rendelkezésünkre, illetve hogy milyen a minta komplexitása. Ha például egy komplex minta fehérjetartalmát akarjuk feltérképezni, akkor az a cél, hogy minél több peptidről gyűjtünk MS/MS spektrumot, tehát minél jobb ciklusidővel használjuk a készüléket, akár a fragmens ionok tömegmérésének pontossága rovására is. Hibrid készülékek esetén (pl. LTQ-Orbitrap) ilyenkor jellemzően CID adatokat gyűjtünk az ioncsapdában kis felbontással, amíg ezzel párhuzamosan a prekursor ionok  $m/z$  értékét méri nagy felbontással az Orbitrap. Nagyon alacsony anyagmennyiségek esetén, mint az „egysejt” analízisek, ugyancsak az ioncsapdához nyúlunk, ami hosszabb csapdázási időt és nagyobb érzékenységet biztosít, de a pontosság rovására. Poszttranszlációs módosítások feltérképezése esetén egy komplex minta analízisének a fentebbiek érvényesülnek, míg egy tisztított fehérje teljes karakterizálása szük-

ségessé teheti, hogy többféle fragmentációs technikát is alkalmazzunk a módosítási helyek pontos meghatározására. Fehérjék *de novo* szekvenálásánál általában elegendő mennyiségű, tiszta anyag áll rendelkezésre, akár többféle enzimmel is megemésztve, ilyenkor a fő szempont az, hogy minél teljesebb legyen a fragmentáció, illetve hogy a fragmenseket is nagy pontossággal detektáljuk a teljes tömegtartományon, ezért itt ütközéses aktiválást használunk és nagy felbontású analízátorral (pl. Orbitrap) mérjük a fragmenseket. Természetesen, szükség esetén további fragmentációt is bevethetünk.

### ■ A megfelelő adatbázis és lekeresési paraméterek kiválasztása

A jól megválasztott lekeresési paraméterek épp olyan fontosak, mint a jól megválasztott mérési módszer, hiszen a lekeresési tér (search space) szabja meg az eredményeinket és azok jóságát, megbízhatóságát. A lekeresési tér azon elemek összessége, amiket a lekeresés során figyelembe veszünk. Az első és legfontosabb elem az adatbázis és annak mérete. Az adatbázis kiválasztásánál fő szempont az, hogy tartalmazza mindazon fehérjéket, amelyek jelen lehetnek a mintában, mindemellett elég nagy legyen ahhoz, hogy az adatok szignifikanciáját jól lehessen becsülni. Ugyanakkor fontos, hogy ne legyen feleslegesen nagy, mert azzal a véletlen találatok halmaza és vele együtt a valós és véletlen találatok halmaza közötti átfedés nő, és így közvetve a valós találatokból veszítünk. A legkézenfekvőbb az, ha a lekeresés során csak a vizsgált faj szekvenciáit vesszük figyelembe. Viszont elég gyakori, hogy még a legnagyobb gonddal végzett minta-előkészítés során is humán keratinokkal vagy más, a biológiai laboratóriumokban gyakran használt fehérjékkel (pl. marhaszérum albumin) szennyeződik a minta. Ezért mindig érdemes az adott fajra szűkítés mellett egy általános szennyező fehérjelistát is hozzáilleszteni az adatbázishoz. Továbbá a teljes minta-előkészítés ismeretében figyelembe vehetünk egyéb fehérjéket is, ami belekerülhetett az emésztményünkbe, pl. az affinitás tisztítás során használt oszlopra kötött fehérjék. Ha fajra (esetleg családra, osztályra, törzsrre) szűkítünk, érdemes ellenőrizni, hogy mennyi fehérje bejegyzést tartalmaz az adatbázis. A Uniprot adatbázisát használva egy jól annotált fajnál, mint a humán, elegendő a Swissprot adatbázist kiválasztani, míg egy kevésbé annotált fajnál (pl. *Drosophila melanogaster*) már érdemes a jóval nagyobb Tremble adatbázist is használni. Előfordulhat az is, hogy egy faj az NCBI adatbázisában jobban van reprezentálva, ilyenkor töltjük le onnan az adott faj fehérjeszekvenciáit.

A tömegspektrometriás fehérjeazonosítás során a legáltalánosabban használt enzim a tripszin, de előfordul, hogy adott mintánál más enzimet vagy enzimkeveréket szükséges használni. Specifikus enzim esetén a lekeresési teret kevésbé befolyásolja, hogy mely aminosavaknál hasít az adott enzim(keverék), illetve azoknak az aminosavaknak mekkora az előfordulási valószínűsége és így a detektált tömegtartományba várható peptidek száma. Ennél valamivel nagyobb hatással van a lekeresési térre az, ha kihagyott hasítóhelyet engedélyezünk. Általában az 1 kihagyott triptikus hasítóhely elegendő, csak akkor vegyük ezt a paramétert nagyobbra, ha limitált emésztést végeztünk vagy a fehérje szekvenciája/emészthetősége ezt szükségessé teszi. Aspecifikus hasításokat pedig csak indokolt esetben használunk, mivel ez a paraméter a legkritikusabb a lekeresési tér mérete szempontjából. Testfolyadékok esetén egyéb (pl. a sejtekből kiszabaduló) proteázok is elhasíthatják a fehérjéket, emellett a szekretált fehérjék *N*-terminális szignál szekvenciájának lehasadása sem feltétlenül esik triptikus hasítóhelyre, így ott érdemes lehet a féltriptikus peptideket is figyelembe venni. A „no enzyme” opciót peptidomikai méréseknél, pl. MHC (major histocompatibility complex) analíziseknél szükséges használni, ahol a szervezet által termelt immuno-peptidekre vadászunk, és eleve nincs emésztés a minta-előkészítés során.

A fehérjék sokszínűségét nemcsak az aminosavak és azok sorrendjének változatossága adja, de az aminosavak oldalláncán előforduló módosítások is. A természetesen előforduló módosítások mellett a minta-előkészítés során is bevezethetünk további módosításokat a fehérjékbe/peptidekbe, amit a lekeresések során figyelembe tudunk venni. Ha egy adott módosítás a minta összes fehérjéjét teljes mértékben érinti (pl. ciszteinek levédése a minta-előkészítés során), azzal állandó módosításként számolunk. Ez a lekeresési teret nem befolyásolja, hiszen az adott aminosavat csak egyféleképpen, az adott módosítással vesszük figyelembe. Ezzel ellentétben egy adott aminosavon változóként beállított módosítás a lekeresési teret megnöveli (lásd fentebb a metionin-oxidáció kapcsán leírtak), és ez a hatás tovább fokozódik, ha a módosítás több aminosavon is előfordulhat (pl. a szabályozó szerepű foszforiláció Ser, Thr, Tyr aminosavakon), vagy többféle módosítást szeretnénk együtt vizsgálni (pl. hiszton kód: Lys metileződés vagy acetileződés, valamint Ser/Thr/Tyr foszforiláció). Ilyenkor eljárhatunk úgy is, hogy előbb elvégzünk egy fajra szűkített lekeresést változó módosítások nélkül a mintában található fehérjék feltérképezésére, majd egy második körben több változó módosítást is megengedünk, de már csak az addig egyértelműen azonosított fehérjéken, azaz úgy tárgyunk az egyik paraméteren, hogy közben leszűkítünk egy másik paramétert, így kontrollálva a lekeresési teret, hogy ne veszítsünk értékes találatokat.

### ■ Mit fogadunk el?

Az adatbázis-lekeresők statisztikai eszközöket használnak, ami alapján megbecsülhető egy találat jósága. Ilyen statisztikai mérő a spektrumok szintjén a szignifikanciahatár vagy a minta egészére vonatkozó FDR-érték. Általánosságban elmondható, hogy minél hosszabb egy peptid, annál inkább lesz egyedi, csak egy fehérjére jellemző szekvenciája, illetve annál több fragmenst ad a spektrumban. Mindkét tényező a peptid azonosításának megbízhatóságát növeli, de csak akkor, ha mind a *N*-, mind a *C*-terminálisra jellemző fragmentumokat detektáltunk, azaz van bizonyítékunk a kezdetről és a végről is. Ugyanígy megbízhatóbb egy fehérje találat, ha több peptid alapján történt az azonosítás. Mindemellett időnként szükség lehet arra, hogy mi magunk ellenőrizzük egy-egy találat megbízhatóságát, pl. egy adott módosítási hely megerősítésére. Ilyenkor kereshetünk jellegzetes fragmentációt a spektrumban. Mind a rezonancia-gerjesztés, mind az ütközéses fragmentáció esetén megfigyelhető, hogy a prolin vagy glicin *N*-terminálisára és az aszparaginsav *C*-terminálisára eső hasadások preferáltak, az ennek megfelelő *b*- és *y*-ionok jellemzően intenzívebb jelet adnak az MS/MS spektrumokban. Az adott azonosítás mellett szólhat, ha nem csak össze-vissza detektálunk különböző típusú fragmens ionokat, hanem megjelennek rövidebb-hosszabb ionsorozatok. A fragmens ionok tömegpontosságának szórása szintén lehet egy indikáció: ha a tömegpontosság mutat bizonyos tendenciát, az megbízhatóbb azonosításra utal. Ugyanakkor gyanúra adhat okot, ha a prekursor mérési hibája nagyon különbözik a többi prekursorétól.

## Hibakeresés

Ha eredményeink elmaradnak a várttól, hiba lehet a minta-előkészítésben, a kromatográfiában, a tömegspektrometriás analízisben, a lekeresésben vagy az elfogadási paraméterekben. Az alábbi ellenőrzésekkel le tudjuk szűkíteni a hiba forrását.

### – Kromatográfia

- báziscsúcs kromatogram (base peak intensity, BPI),
- teljes ionáram (total ion current, TIC).

Ha nem érjük el a várt jelintenzitást, akkor lehet, hogy kevesebb anyaggal dolgoztunk, mint amire számítottunk. A kiindulási anyagmennyiség ellenőrizhető fehérjekoncentrá-

ció-méréssel, emésztés után peptidkoncentráció-méréssel, erre különböző tesztrendszerek (BCA, Bradford, peptid kolorimetriás vizsgálat stb.) elérhetők. A kromatogram árulkodik a kromatográfiás rendszer állapotáról is (a kromatogram csúcsgazdagsága, a csúcsok szimmetriája, szélessége), lásd 4. fejezet.

### – MS és MS/MS adatok

Bármilyen szokatlan az MS és MS/MS adatokban – pl. csúcสดuplázódás, elromlott felbontás, alacsony jel-zaj arány vagy a prekursor nem/alig fragmentálódik – arra utal, hogy a tömegspektrométer nem megfelelően működik.

### – Lekeresési paraméterek, lekeresés eredményei

Egy gyors ellenőrzéssel megbizonyosodhatunk, hogy valóban a megfelelő paramétereket állítottuk-e be. A paraméterek beállításához/változtatásához segítség lehet olyan szoftver alkalmazása, amely egy gyors előnézeti képet ad arról, hogy megfelelően hasított-e az enzim, a derivatizálás milyen hatékonysággal mentek, milyen arányban fordulnak elő a leggyakoribb mellékreakciók és módosítások, megfelelő volt-e a mérési pontosság, és ha nem, akkor újrapalibrál. Ilyen szoftver hiányában ezeket az információkat a lekeresés eredményeiből mi magunk is kigyűjtjük:

#### ■ Tömegpontosság

A prekursor ionok és a fragmensek tömegpontosságának ellenőrzésével kiderül, hogy a készülék kalibrációja megfelelő volt-e. Ha a tömegpontosságok eltérnek a várttól, egyes szoftvereknél lehetőség van az adatok utólagos kalibrálására, más szoftvereknél szisztematikus hibát is be lehet állítani, vagy a legegyszerűbben a tömegpontosságot szélesebbre lehet nyitni, de utóbbi megoldással a lekeresési teret növeljük meg.

#### ■ Kihagyott hasítóhely

Ha rendben ment az emésztés, akkor az azonosított peptidek többsége nem tartalmaz kihagyott hasítóhelyet és kevés az egy kihagyott hasítóhelyes peptid is. Ha ez az arány eltolódik az egy kihagyott hasítóhelyet tartalmazó peptidek felé, akkor az emésztés nem ment végbe megfelelően. Ennek oka lehet, ha kevés enzimet adtunk a mintához vagy az emésztés körülményei nem voltak megfelelőek (pH, hőmérséklet, időtartam), esetleg egyéb reagens (detergens, proteázinhibitor) akadályozta az emésztést.

#### ■ Állandó módosítások megléte

Érdemes ellenőrizni, hogy az állandóként beállított módosítás valóban állandó volt-e, azaz teljes volt-e pl. a cisteinek derivatizálása vagy kvantitáláskor a jelölés mértéke. Amennyiben a derivatizáció nem volt teljes, a módosításokat változóként kell figyelembe venni, ami a lekeresési teret növeli.

#### ■ Változó módosítások megléte

Ha bizonyos poszttranszlációs módosításokra vadászunk, akkor a módosított peptidek hiánya/alulreprezentáltsága többféle okra is visszavezethető. A módosítás alacsony szintje esetén szükség lehet dúsítani vagy legalább frakcionálni az emésztményt, esetleg az adatgyűjtési paramétereken változtatni. Dúsítás esetén előfordulhat, hogy annak hatékonysága nem volt elégséges.

#### ■ Megfelelő adatbázist használtunk-e?

Adatainkat a teljes SwissProt adatbázisban, szűkebbre vett paraméterekkel (kihagyott hasítóhely, változó módosítások elhagyása) lekeresve felderíthető, ha esetleg más faj fehérjei (pl. sejtenyészet befertőződése) szennyezik a mintánkat.

**Ajánlott irodalom**

1. Biemann K. Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods Enzymol.* 1990; 193:886-7.
2. Cottrell JS. Protein identification using MS/MS data. *J Proteomics.* 2011; 74(10):1842-51.
3. Lau KW, Hart SR, Lynch JA, et al. Observations on the detection of b- and y-type ions in the collisionally activated decomposition spectra of protonated peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2009; 23(10):1508-14.
4. Medzihradszky KF, Chalkley RJ. Lessons in de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2015; 34(1):43-63.
5. Mikesch LM, Ueberheide B, Chi A, et al. The utility of ETD mass spectrometry in proteomic analysis. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1764(12):1811-22.
6. Nesvizhskii AI. A survey of computational methods and error rate estimation procedures for peptide and protein identification in shotgun proteomics. *J Proteomics.* 2010; 73(11):2092-123.
7. Paizs B, Suhai S. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrom Rev.* 2005; 24(4):508-48.
8. Verheggen K, Martens L, Berven FS, Barsnes H, Vaudel M. Database Search Engines: Paradigms, Challenges and Solutions. In: Mirzaei H, Carrasco M (eds.). *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 919. Cham, Springer, 2016; 147-56.



## 8. KVANTITATÍV PROTEOMIKA

Csősz Éva

A proteomikai kutatások hajnalán elsősorban a fehérjék minőségi analízisére volt lehetőség. Megbízható mennyiségi információt csak később, a megfelelő analitikai módszerek és kellően érzékeny és gyors tömegspektrométerek kifejlesztésével, a 2000-es évek elejétől tudunk rutinszerűen gyűjteni (lásd 2. fejezet).

A **fehérjék mennyiségéről is adatot szolgáltató, ún. kvantitatív proteomikai** módszereket számos esetben lehet alkalmazni a biológiai funkciók pontosabb megértéséhez, a betegségek patomechanizmusának megismeréséhez, valamint a diagnosztikai céllal felhasználható marker molekulák azonosításához. A fehérje jelenlétéről vagy állapotáról információt adó technikák mellett, a kvantitatív proteomikai módszerek segítségével nyert adatok révén a biológiai változások dinamikája jobban nyomon követhetővé válik.

Számos tanulmány, könyv és összefoglaló foglalkozik a témával. E fejezet célja az alapismeretek bemutatása, amelyek segítségével az olvasó eligazodhat a változatos módszerleírásokban, megérthet, tervezhet és értelmezhet kvantitatív proteomikai kísérleteket. További információ nyerhető például az *Eyers és Gaskell* által szerkesztett könyvből.<sup>[1]</sup>

Amikor kvantitálásról beszélünk, legyen itt szó bármilyen típusú kvantitatív adat nyeréséről, mindig nagyon fontos a **lineáris dinamikus tartomány** megállapítása. Fontos kiemelni, hogy csak akkor tudunk pontos kvantitatív adatot megadni (és akkor érdemes azt elfogadni), ha az analitikai módszerrel kapott jel változása egyenesen arányos a jelet adó fehérje mennyiségének a változásával. Ez a feltétel csak a lineáris dinamikus tartományon belül teljesül. Az ezen kívül eső értékek nem megbízhatók, és nem javasolt felhasználásuk kísérletek tervezésénél vagy következtetések levonásánál!

A kvantitatív proteomika keretén belül több módszert használhatunk a fehérjék **relatív vagy abszolút kvantitálására**.<sup>[2,3]</sup> Az **abszolút kvantitálás** során a fehérje pontos mennyiségét vagy koncentrációját lehet megadni, míg **relatív kvantitálással** adott fehérjék egyes mintákban mérhető, egymáshoz viszonyított mennyiségi változásainak vizsgálatát tudjuk elvégezni. A tömegspektrometriás fehérjekvantitálás mellett többféle módszer alkalmazható (mint például az immunológiai módszerek, pl. ELISA, aptamer alapú technológiák, vagy a különböző képpalkotó módszerek) a relatív vagy abszolút kvantitatív információk kinyerésére. Mindegyik módszernek megvannak a maga előnyei, hátrányai, valamint javasolt alkalmazási területei. E fejezetben csak a tömegspektrometriás kvantitálási módszereket ismertetjük.

A tömegspektrometria alapú kvantitálás – az esetek igen jelentős részében – csak relatív kvantitálást tesz lehetővé, viszont egy analízis során, az alkalmazott tömegspektrométertől függően, egy mintából több száz fehérje mennyisége is megállapítható. Többféle – jelölést alkalmazó, illetve nem alkalmazó – tömegspektrometriás módszer áll rendelkezésre a fehérjék relatív kvantitálására, és az ún. célzott proteomikai módszerek alkalmazásával, akár abszolút kvantitálást is végezhetünk. Az abszolút kvantitálást, amikor az adott fehérje pontos koncentrációját (mennyiségét vagy kópiaszámát) adjuk meg, elsősorban a klinikumban, a gyógyszeriparban, és kismértékben a kutatásban, csak bizonyos speciális kutatási kérdések megválaszolására (pl. komplexek sztöchiometriájának tanulmányozása) használjuk. Fontos kiemelni, hogy annak ellenére, hogy a tömegspektrometria alapú proteomikai analízis alkalmas ab-

szolút kvantitálásra, a legtöbb kutatási feladat során a feltett kérdések döntő többsége megválaszolható az egyszerűbben és olcsóbban kivitelezhető relatív kvantitálás alkalmazásával. Ezért a továbbiakban csak a proteomikában leggyakrabban használt relatív kvantitálási módszereket fogjuk bemutatni.

### Fehérjék relatív kvantitálása

A fehérjék relatív kvantitálása során egy (vagy több) fehérje különböző mintákban mért, egymáshoz viszonyított arányát, vagy egy adott fehérje egy ismert mennyiségű standard fehérjéhez képesti arányát tudjuk megadni. A relatív kvantitálás történhet shotgun vagy célzott módszerek alkalmazásával is (a módszerek részletes leírását *lásd a 6. fejezetben*). A shotgun adatgyűjtési módok jelölést vagy jelölés nélküli módszereket egyaránt használhatnak.

### Jelölést alkalmazó relatív kvantitálási módszerek

A jelölést alkalmazó technikák lényege, hogy stabil izotópot tartalmazó jelölő anyagot kötnek az egyes mintákban levő fehérjékre, peptidekre vagy juttatnak be a fehérjékbe, és ezeket a csoportokat detektálják a tömegspektrometriás analízis során. A stabil izotópok közül leggyakrabban a  $^{14}\text{C}$  és  $^{15}\text{N}$  izotópokat használják. A deutérium tűnhetne egyébként kényes megoldásnak, viszont itt előfordulhat, hogy a deuterált peptid/fehérjék eltérően viselkednek a kromatográfia során, és a jelölt és jelöletlen azonos szekvenciájú peptid nem egyszerre eluálódna. Ez jelentős problémákat okozhat az adatok kiértékelése során, emiatt a deutériumot csak nagyon ritkán használják erre a célra.

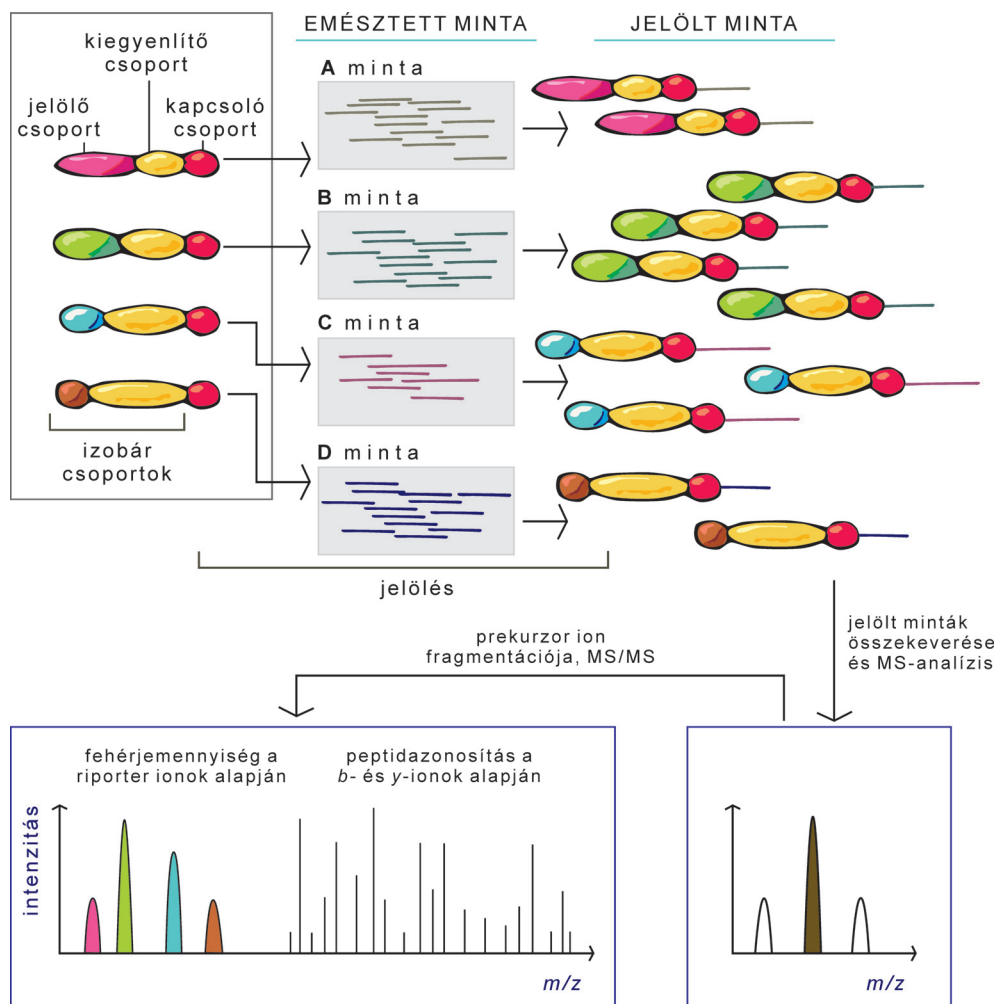
Többféle jelölési módszer létezik, a továbbiakban csak a két leggyakrabban alkalmazott jelölési módszert, a kémiai és a metabolikus jelölést fogjuk ismertetni.

A **kémiai jelölés** során bármilyen biológiai mintát lehet kémiai reakció révén jelölni azáltal, hogy egy reaktív csoportot tartalmazó jelölő anyagot jól meghatározott és gyors kémiai reakció során hozzákapcsolunk a peptidlánc egy adott kémiai csoportjához.

Minden vizsgálni kívánt mintát megjelölünk stabil izotópot tartalmazó reagenssel, majd ezeket összekeverjük.

Számos stabil izotópot alkalmazó jelölőanyagot dobtak piacra, ezek közül csak a legelterjedtebb típust fogom ismertetni.

A **TMT** (tandem mass tag) esetben<sup>[4]</sup> olyan stabil izotópot tartalmazó jelölő reagenset alkalmaznak, amelyek elsősorban a fehérjék N-terminálisához, illetve a lizin-oldalláncok  $\epsilon$ -aminocsoportjához kapcsolódnak. A jelölő reagens tartalmaz egy jelölő csoportot, egy kiegyenlítő csoportot, valamint egy kapcsoló csoportot, amely a mintában levő fehérjék aminocsoportjához való kapcsolódást biztosítja (**8.1. ábra**). Korábban hasonló elven működő **iTRAQ** (izobár jelölés abszolút és relatív kvantitáláshoz – isobaric tag for relative and absolute quantitation) jelölést is alkalmaztak,<sup>[5]</sup> de mára már gyakorlatilag kiszorult a mindennapi használatból. A jelölő csoport tömege változó (iTRAQ esetén a 113–121 Da, míg TMT esetén a 126–134 Da tartományba esnek), és ennek megfelelően a kiegyenlítő csoport tömegét úgy választják meg, hogy a jelölő csoporttal együtt azonos tömeget biztosítsanak (izobár) mindegyik jelölő reagensnek. A különböző jelölő csoporttal rendelkező izobár jelölő reagenssekkel jelölt mintákat összekeverjük, és egy mintaként, egy tömegspektrometriás analízis során vizsgáljuk. A tömegspektrometriás analízis során az MS1 spektrumban a peptidre jellemző csúcsok azonos  $m/z$  értéknél detektálhatók, de a fragmentáció során a jelölő csoportra jellemző fragmensek is megjelennek. Ezeket a fragmenseket riporter ionoknak nevezzük (**8.1. ábra**). A jelölő csoportra jellemző jeleket külön-külön lehet detektálni az



**8.1. ábra.** Az izobár kémiai jelölés sémája. A jelölő csoport (különböző színnel jelölve) és a kiegyenlítő csoport (sárgával jelölve) együttesen azonos tömeggel rendelkeznek (izobár csoport) minden jelölő esetében. A fehérjékhez/peptidekhez való kapcsolást a kapcsoló csoport (piros) teszi lehetővé. A különböző jelölőkkel megjelölt mintákat összekeverik, majd egy MS analízis során vizsgálják. A jelölő csoport és a kiegyenlítő csoport közötti kötés nagyon érzékeny a fragmentációra, ezért a tömegspektrométerben történő fragmentáció során a peptidre jellemző (többnyire *b* és *y*) ionok mellett a jelölőkre jellemző, ún. riporter ionok is megjelennek. Így egy spektrumból kaphatunk a peptid szekvenciájára, valamint az egyes mintákban jelen levő fehérjék mennyiségére vonatkozó információt.

MS/MS spektrumokban, és a csúcsok alatti terület, az intenzitás vagy a jel-zaj arány érték minden esetben arányos az adott jelölő csoport koncentrációjával, vagyis a jelölt peptid és az annak megfelelő fehérje mennyiségével.

### Előnyök:

- a fehérjék aminosav-oldalláncaihoz változatos kémiai szerkezetű jelölő anyagok kapcsolhatók,

- bármilyen biológiai mintát lehet jelölni,
- multiplex, egyszerre több, akár 18 különböző minta is jelölhető (TMTPro18plex),
- lehet jelölni a fehérjéket vagy enzimatis emésztés után a peptideket. Mivel a fehérjék jelölése csökkentheti a tripszines emésztés hatékonyságát (módosított lizint nem biztos, hogy hasít a tripszin), főként a peptideket javasolt jelölni,
- a jelölt mintákat összekeverjük, ezért a tömegspektrometriás analízis variabilitása kiküszöbölődik, és az analízis ideje jelentősen lecsökken,
- a minták keverésével növelhető az áteresztőképesség (időegység alatt több mintát tudunk vizsgálni),
- a keverés miatt megnövelt fehérje mennyiség lehetőséget biztosít a frakcionálásra, és ezáltal több információ nyerhető („mélyebbre lehet ásni a proteomban”),
- a különböző jelölőanyaggal jelölt minták egymáshoz viszonyított aránya megadható,
- a kvantitatív adatok mellett a peptid szekvenciájára vonatkozó információt is nyerhetünk,
- a módszer lineáris dinamikus tartománya viszonylag tág – a biológiai változások vizsgálatára felhasználható.

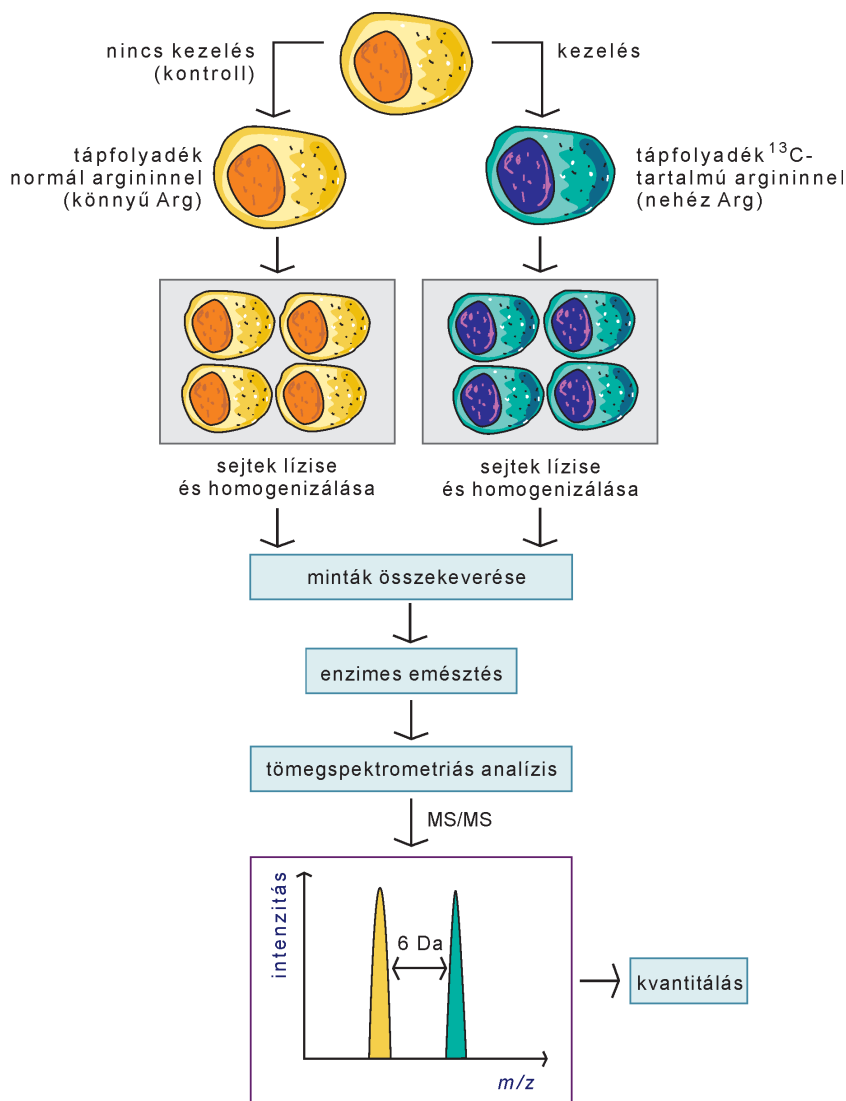
### Hátrányok:

- a kapcsolódás hatékonysága sosem 100%,
- nem kívánt melléktermékek keletkezhetnek (pl. más aminosavak is jelölődhetnek, ami komplikációt okozhat az adatok kiértékelése során),
- költséges,
- a jelölő anyag jelenléte miatt optimalizálni kell a fragmentációt, megfelelő fragmentációs technikát kell választani,
- koelulálódó komponensek torzíthatják az eredményeket,
- gondos tervezést igényel,
- a vizsgálat során begyűjtött adathalmaz a vizsgálat befejezése után nem bővíthető. Egy másik vizsgálatból származó, vagy később kivitelezett analízis eredménye nem illeszthető be egy az egyben az adatok közé.

A **metabolikus jelölés** során olyan stabil izotóppal jelzett anyagot juttatunk a tápfolyadékba, amelyet a sejtek a növekedésük során felvesznek, és beépítenek a saját fehérjéikbe. Célszerű úgy megválasztani a jelölő anyagot, hogy legalább 4–6 Da tömegnövekedést biztosítson a jelölt fehérjéknek minden egyes beépülési ponton. A jelölt (nehéz) és jelöletlen (könnyű) sejteket homogenizáljuk és összekeverjük, majd ugyanazon tömegspektrometriás analízis során vizsgáljuk. Az adatok kiértékelése során a jelölés révén keletkező tömegnövekedést tudjuk detektálni a spektrumban (**8.2. ábra**), és a jelölt és jelöletlen peptidek intenzitásának vagy görbe alatti területének arányából tudjuk megmondani a mintában levő fehérje arányokat.

### Előnyök:

- 100%-os jelölést biztosítanak, a jelölő anyag (pl. esszenciális aminosav) teljes mértékben beépül a fehérjékbe,
- viszonylag könnyen kivitelezhető,
- a jelölt mintákat összekeverjük, ezért a tömegspektrometriás minta-előkészítés és analízis variabilitása kiküszöbölődik, és az analízis ideje jelentősen lecsökken,
- a minták keverésével növelhető az áteresztőképesség (időegység alatt több mintát tudunk vizsgálni),



8.2. ábra. A metabolikus jelölés sémája

- a keverés miatt megnövelt fehérje mennyiség lehetőséget biztosít a frakcionálásra, és ezáltal több információ nyerhető („mélyebbre lehet ásni a proteomban”),
- a különböző jelölő anyaggal jelölt minták egymáshoz viszonyított aránya megadható.

#### Hátrányok:

- költséges,
- csak sejtkultúrákra alkalmazható,
- bizonyos sejtek kiemelt figyelmet igényelnek (speciális tápfolyadék stb.), ezért tenyésztésük nehézkes lehet,

- viszonylag kevés (nagy felbontású készülékkel is csak legfeljebb négy) minta összehasonlítása lehetséges,
- a jelölő anyagot úgy kell megválasztani, hogy minden fehérjében megtalálható legyen, és a sejt metabolizmusa során ne alakuljon át más vegyületté.

A *SILAC* (Stable Isotope Labeling of Amino acids in Cell cultures) módszer segítségével nyert kvantitatív adatok<sup>[6]</sup> sokrétűen felhasználhatók komplex biológiai kérdések megválaszolásra. Hátrányai miatt a rutin kvantitatív analízisekből mára már gyakorlatilag kiszorult, viszont egy módosított változata, az ún. pulse *SILAC* módszer<sup>[7,8]</sup> például, kiválóan alkalmazható fehérjéket érintő változások dinamikájának nyomon követésére, fehérjék turnoverének vizsgálatára.

### **Jelölést nem alkalmazó relatív kvantitálási módszerek**

A **jelölés nélküli kvantitálás** (label-free quantification) olyan tömegspektrometriás kvantitálási módszer, amely nem alkalmaz semmiféle jelölő anyagot.<sup>[9]</sup> A mintákat egymás után vizsgálják, és a vizsgálat során bekövetkező MS/MS események számát (spektrumszámolás) vagy a prekursor ion intenzitását (MS1 alapú mennyiségi meghatározás) használják a kvantitáláshoz. Ugyanis minél több MS/MS készül egy fehérjéről vagy minél nagyobb a kiválasztott prekursor ion intenzitása, annál nagyobb koncentrációban van jelen a fehérje a mintában (**8.3. ábra**).

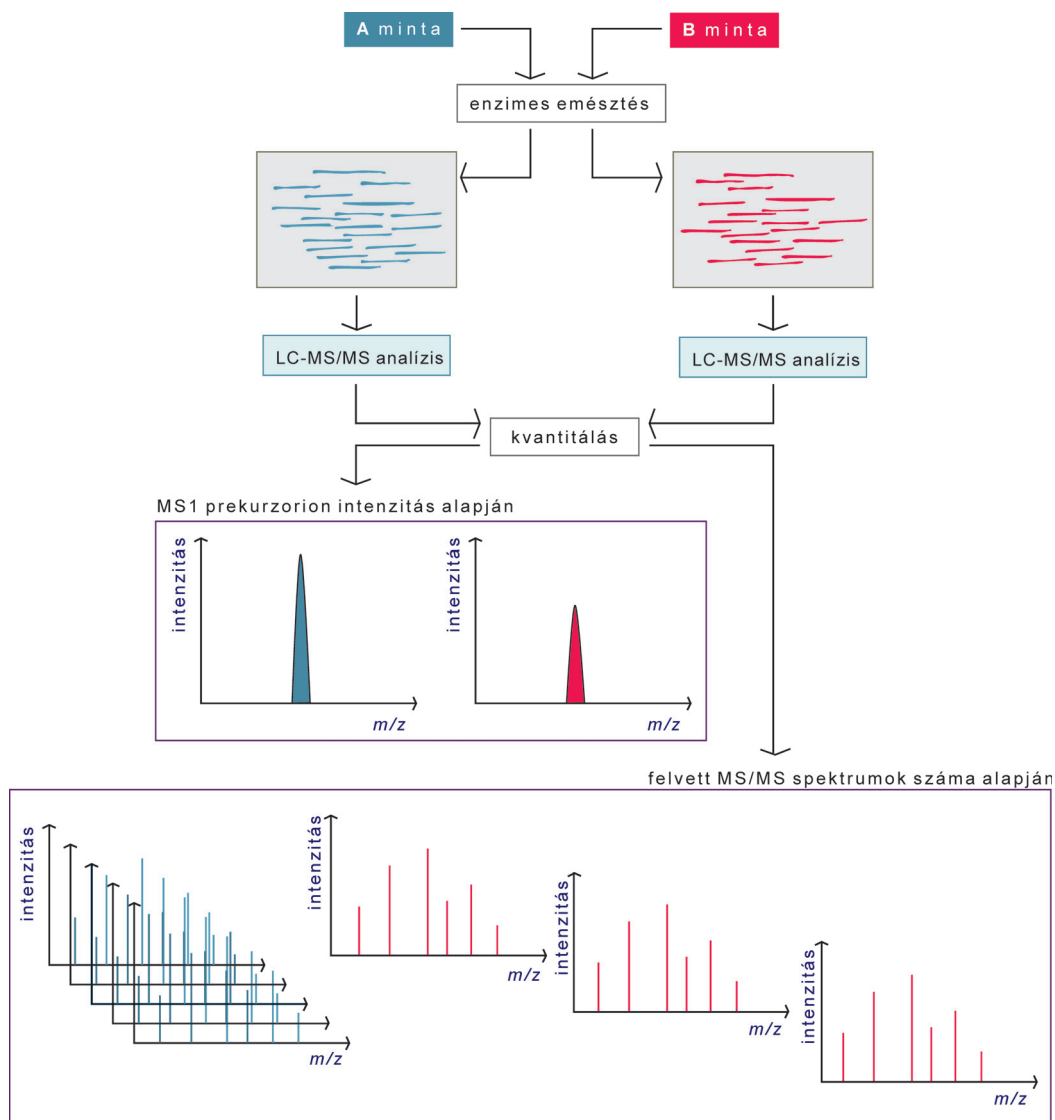
Figyelembe véve a módszer egyszerűségét, ha van elegendő mintamennyiség, a jelölés nélküli kvantitálás az általánosan elterjedt módszer a fehérjék mennyiségének vizsgálatára.

#### **Előnyök:**

- nem alkalmaz jelölő anyagot, emiatt egyszerűbb és olcsóbb a minta-előkészítés,
- megfelelő optimalizálással jól használható,
- számos szoftver támogatja az adatok kiértékelését, pl. az egyes tömegspektrométer gyártók által fejlesztett, saját adatokat támogató ProteomeDiscoverer (ThermoScientific), Analyst (Sciex), a bármilyen tömegspektrométerrel gyűjtött adatokat analizálni képes, ún. platformfüggetlen szoftverek, mint a Scaffold (Proteome Software) vagy a szabadon hozzáférhető MaxQuant,<sup>[10]</sup>
- relatív kvantitálást tesz lehetővé,
- egy projekten belül tetszőleges számú minta vizsgálható, az összehasonlítható minták száma nem limitált,
- a vizsgálat során begyűjtött adathalmaz a vizsgálat befejezése után bővíthető. Egy másik vizsgálatból származó vagy később kivitelezett analízis eredménye beilleszthető az adatok közé. Azonban fontos itt megjegyezni, hogy ezt a lehetőséget csak jól beállított, stabilan működő rendszerek esetében, megfelelő belső standardokkal együtt érdemes használni, különben torzított eredményeket kaphatunk,
- elterjedt.

#### **Hátrányok:**

- nem bármely tömegspektrométer által gyűjtött adat alkalmas ilyen jellegű kvantitálásra,
- javasolt a mintába belekeverhető belső standardok használata (pl. iRT peptidkeverék – lásd 4. fejezet) az analízisek során, ami növeli az analízis költségét.



**8.3. ábra.** A jelölés nélküli kvantitálás munkafolyamata. Az analízis során a kvantitáláshoz felhasználható mindkét adattípus rögzítésre kerül, az egyes alkalmazott analitikai szoftverek (vagy ha van erre lehetőség, akkor a felhasználó) döntik el, hogy a kvantitálás az intenzitás vagy a spektrumszámlálás alapján történik.

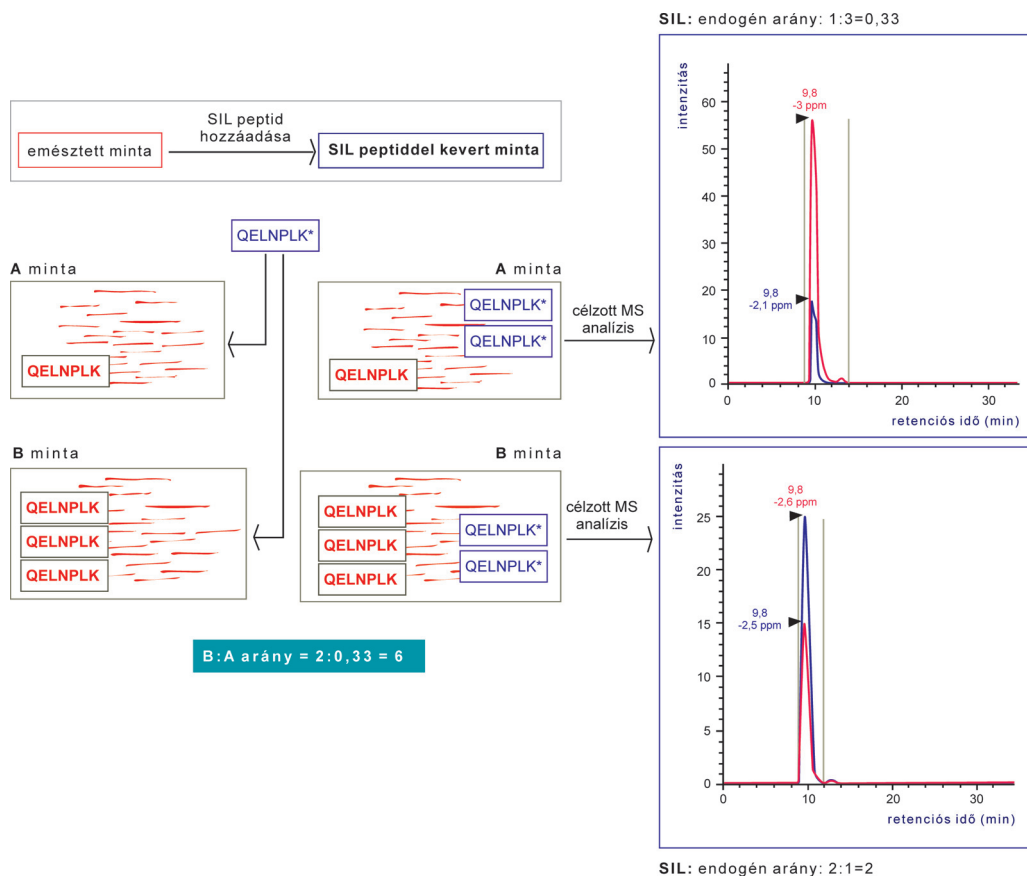
### Célzott proteomikai módszerek

A célzott proteomikai analízisek során előre meghatározott fehérjék mennyiségét vizsgáljuk. A shotgun kvantitálási módszerekkel ellentétben, a célzott módszerek során szükség van a vizsgálni kívánt fehérje ismeretére. Viszont azáltal, hogy pontos információval rendelkezünk a vizsgálandó fehérjéről, specifikus és szenzitív MRM/SRM vagy PRM módszereket



(lásd 6. fejezet) lehet tervezni.<sup>[11]</sup> A célzott módszerek során az egyes átmenetekre (lásd 6. fejezet) kapott jelekből a kapcsolt kromatográfiás elválasztás (online LC) során kialakuló csúcs, pontosabban a csúcs alatti terület arányos a fehérje mennyiségével, így a fehérje mennyisége megállapítható.

Ahhoz, hogy megbízható információt kapjunk, az **MRM/SRM** módszerek esetében feltétlenül szükség van a *stabil izotóppal jelzett (SIL)* szintetikus peptidek alkalmazására.<sup>[11]</sup> Ezek olyan peptidek, amelyek mindenben megegyeznek a mintában jelen levő, vizsgálandó, ún. endogén peptiddel, viszont az egyik aminosavuk (tipikusan a C-terminális lizin vagy arginin) C- és N-atomok stabil izotópját tartalmazza, így 6–10 Da-nal nagyobb tömeggel rendelkeznek, mint az endogén peptidek. A mintához hozzákeverve a SIL peptidek kvalitatív és kvantitatív referenciaként szolgálnak. A spektrumban levő csúcs csak akkor fogadható el, ha átfedést mutat a vizsgálni kívánt endogén és a mintához hozzáadott SIL peptid csúcsa, vagyis koelúció figyelhető meg, és a csúcsalak is azonos. Mivel mindegyik mintához ugyanolyan mennyiségben kevertük hozzá a SIL peptideket, a SIL és az endogén peptid arányának változása a mintában levő endogén peptid mennyiségi változását fogja tükrözni (8.4. ábra).



**8.4. ábra.** Célzott proteomikai kvantitálás SIL peptidek alkalmazásával. Az emésztett minták mindegyikéhez hozzákeverjük a megfelelő SIL peptidet (késsel jelölve), majd elvégezzük a keverékek analízisét. A koelválódó SIL (kék) és endogén (piros) spektrumok görbe alatti terület arányaiból megadható az adott peptid relatív mennyisége az egyes mintákban. Az ábrán bemutatott példában a B mintában a vizsgált peptid hatszor nagyobb mennyiségben van jelen, mint az A mintában.

A célzott kvantitálási módszerek megbízhatóságát kihasználva klinikai laboratóriumokban diagnosztikai célokra is felhasználható módszereket is lehet létrehozni. Ilyen jellegű módszergyűjtemény a CPTAC (Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium) honlapján található (<https://proteomics.cancer.gov/assay-portal>).

### Előnyök:

- nem jelöljük a biológiai mintát, egyszerűbb a minta-előkészítés,
- megfelelő optimalizálással jól használható,
- relatív vagy abszolút kvantitálást is lehetővé tesz,
- érzékenysége jó, a detektálási határ alacsony,
- a lineáris dinamikus tartomány széles,
- az adatok kiértékelése könnyen használható, ún. platformfüggetlen szoftverrel (Skyline – [www.skyline.ms](http://www.skyline.ms)) is történhet,
- gyors, rutin analízisben is használható,
- olyannyira megbízható és reprodukálható eredményeket ad, hogy klinikai laboratóriumokban is használható.

### Hátrányok:

- csak a kiválasztott peptidekről kapunk információt, a többi peptidről nem,
- elengedhetetlen a SIL peptidek használata, ami növeli a költségeket,
- elengedhetetlen a vizsgálni kívánt fehérjék ismerete, azaz semmilyen más információt nem kapunk, csak a vizsgálni kívánt peptidek (fehérjék) mennyiségi viszonyait,
- pontos módszertervezés és optimalizálás szükséges, ami költség és időigényes lehet.

A **PRM** esetben<sup>[12]</sup> nem feltétlenül szükséges a SIL peptidek használata, ugyanis itt minden fragmens ion begyűjtésre kerül, és a felvett MS/MS spektrumok alapján a peptid biztonsággal azonosítható. Az MRM/SRM analízisekhez hasonlóan, a kvantitálás a PRM esetében is az egyes peptidek csúcs alatti területeiből történik. A PRM rendelkezik az MRM/SRM módszer előnyeivel, ugyanakkor az MRM/SRM jónéhány hátránya kiküszöbölhető.

### Előnyök:

- nem jelöljük a biológiai mintát, egyszerűbb a minta-előkészítés,
- nagy az áteresztőképessége, egy mintában több ezer peptid vizsgálata lehetséges,
- elég a megfelelő peptidek ismerete, nem szükséges megtervezni az egyes átmeneteket, ami jelentősen gyorsítja a módszertervezést,
- minden fragmensről van információnk, így pontosan azonosíthatók a peptidek,
- az egyedi SIL peptideket egy peptidkeverékkel lehet helyettesíteni (pl. a korábban említett iRT peptidek vagy speciális, az adott vizsgálathoz készített keverékek), és ez használható a kvantitáláshoz, ami jelentős költségcsökkentéssel jár,
- SIL peptidek alkalmazásával nagy biztonsággal használható kvantitálásra,
- az adatok kiértékelése könnyen használható, ún. platformfüggetlen szoftverrel (Skyline) is történhet,
- a lineáris dinamikus tartomány széles,
- relatív vagy abszolút kvantitálást tesz lehetővé.

### Hátrányok:

- csak nagy érzékenységű és gyors tömegspektrométerekkel érdemes használni, pl. Orbitrap,

- csak a kiválasztott peptidekről kapunk információt, a többi peptidről nem,
- ha a mintában kisebb mennyiségben van jelen a vizsgált peptid, előfordulhat, hogy a fragmensek alapján a kvantitálás lehetséges lenne, de nem tudjuk biztonságosan azonosítani a peptidet. Emiatt, ha a kísérlet anyagi keretei lehetővé teszik, mindenképp javasolt a SIL peptidek használata.

### **Kvantitálás adatfüggetlen módszerek segítségével**

Az adatfüggetlen analitikai módszerekkel (DIA, SWATH, lásd 6. fejezet) begyűjtött adatok a fehérjék azonosítása mellett alkalmasak a fehérjék mennyiségének meghatározására is.<sup>[13]</sup> A 6. fejezetben ismertetett módon, az adatfüggetlen adatgyűjtéssel nyert információkból a célzott tömegspektrometriás analízishez hasonló, egyedi peptidekre jellemző adatokat tudunk kinyerni. Ha ismerjük a vizsgálni kívánt fehérjét, akkor a rá jellemző peptidekről, valamint annak fragmenseiről begyűjtött információ kikereshető az adathalmazból. Ily módon kvantitatív információ nyerhető ki a korábban rögzített, ún. digitális proteomokból.

#### **Előnyök:**

- nem alkalmaz jelölő anyagot, egyszerűbb a minta-előkészítés,
- az összes lehetséges adat begyűjtésre kerül,
- nem szükséges előre ismerni a kvantitálni kívánt fehérjéket és megtervezni a módszereket,
- relatív kvantitálást tesz lehetővé,
- az adatok kiértékelésére a célzott proteomikai elemzéseknél használt szoftver is használható,
- később, akár más szempontokat figyelembe véve (más fehérjékre fókuszálva) újraelemezhetők az eredmények.

#### **Hátrányok:**

- csak nagy érzékenységű és kellően gyors tömegspektrométerekkel lehet ilyen jellegű adatokat begyűjteni,
- az egyes analízisek közötti variancia (CV%) sokszor magas,
- ha nem használunk referencia peptidkeveréket, az egyes analízisek eredményeinek összehasonlítása problémás lehet.

### **Módszertervezési szempontok**

A megfelelő módszer kiválasztásához több szempontot kell figyelembe venni. A módszertervezés során a legkritikusabb faktor a **mintaszám**, valamint az **analitikai rendszer változatlanságának a biztosítása**. Ezeket a faktorokat azért kiemelten fontos kontrollálni, mert csak így biztosítható, hogy a megfigyelt változások ténylegesen a minták közötti különbségeket mutassák.

A **megfelelő mintaszám** meghatározása statisztikai próbák segítségével történik. Fontos, hogy legyen elég minta, hogy a megfelelő következtetéseket vonhassuk le, és ha biztosak akarunk lenni az eredményünk megbízhatóságában, akkor például humán betegminták vizsgálata során javasolt a több ezres, de legalább több százas mintaszám. Ugyanakkor, ha a költséghatékonyságot és a rendelkezésre álló minták számát is figyelembe vesszük, az egy vizsgálatba ténylegesen bevonható minták/betegek száma általában messze alulmarad az ideálshoz képest. Ilyen esetekben elengedhetetlen a statisztikai próbák elvégzése, hogy lássuk, hogy a rendelkezésre álló mintaszám ténylegesen használható-e a megfelelő következtetés levonására.<sup>[14]</sup>

Mivel kísérleteink döntő többségében relatív kvantitálást végzünk, ezért javasolt, hogy az egy kísérlethez tartozó összes mintát a lehető legrövidebb idő alatt, ideális esetben, egyszerre mérjük le. Fontos, hogy a kísérlet első és utolsó mintája között lehetőség szerint ne teljen el sok idő, ne legyenek módosítások a rendszerben (analitikai oszlop cseréje, alkatrészek cseréje stb.), hogy többé-kevésbé ugyanazokat a körülményeket tudjuk biztosítani minden egyes minta analízise során. Ez az állapot nem mindig fenntartható, főleg akkor, ha nagyobb, több hétig tartó vizsgálat zajlik. Ahhoz, hogy az egyes csoportok közötti összehasonlíthatóságot biztosítani tudjuk, a **randomizálást és a csoportosítást** szoktuk alkalmazni.<sup>[15]</sup> A csoportosítás során mintacsoportokat képezünk, amelyeket azután a vizsgálat teljes ideje alatt egységként kezelünk. A mintacsoportot (blokk) úgy állítjuk össze, hogy mindegyik vizsgálandó csoportból tartalmazzon egy véletlenszerűen kiválasztott mintát. Az így képezett mintacsoportba tartozó minták esetében egyszerre végezzük el a teljes minta-előkészítést és a tömegspektrometriás analízist. Ha ismételni szükséges a kísérletet pl. mérési hiba miatt, akkor a teljes blokk analízisét megismételjük. Ezen kívül, ha van rá lehetőségünk, mindenképp érdemes adott mennyiségű peptidkeveréket (pl. iRT peptideket, vagy általunk összeállított peptidkeveréket) hozzáadni minden analízis előtt a mintákhoz. Az azonos mennyiségben hozzáadott ismert peptidkeverék vizsgálatával kapott jel felhasználható normalizálásra. Hosszabb ideig tartó, nagyobb mintasorozatok analízisei esetén minden mintacsoportba érdemes egy minőségellenőrző keveréket (QC – quality control) beiktatni. A QC keveréket ideális esetben az összes minta egyenlő arányú keverésével készítjük el, porciózzuk és az egyes csoportba tartozó mintákkal együtt dolgozzuk fel és vizsgáljuk.

A módszertevezésbe az is beletartozik, hogy melyik kvantitálási módszert használjuk a kérdésünk megválaszolására. Természetesen ez elsősorban a kérdés jellegétől és a rendelkezésre álló minták mennyiségétől és számától függ.<sup>[16]</sup> A megfelelő módszer kiválasztása a megválaszolandó kérdés, valamint a korábban részletezett módszerek előnyeinek és hátrányainak figyelembe vételével történik. Ismeretlen összetételű minta vizsgálatánál elsősorban a shotgun módszereket alkalmazzuk, ha viszont pontosan tudjuk, mely fehérjéről kívánunk kvantitatív információt begyűjteni, akkor mindenképp a célzott módszerek használata javasolt. A módszerválasztást befolyásolja a rendelkezésre álló analitikai rendszer és a mintamennyiség. Kis mennyiségű ismeretlen mintáknál érdemes elgondolkodni a TMT használatán, mert a különböző csoportba tartozó és különböző TMT jelölővel kezelt minták összekeverésével növelni tudjuk a vizsgálandó fehérje mennyiségét.

## Kritikus lépések

A relatív kvantitálás során kifejezetten fontos annak biztosítása, hogy minden minta proteomját ugyanazok a hatások ériék, ugyanúgy legyenek kezelve a minta-előkészítés során *(további részletek a 3. fejezetben kerültek ismertetésre)* és ugyanúgy legyenek elemezve a tömegspektrometriás analízis alatt. A kritikus lépések az alábbiak:

- sejtek/szövetek lízise,
- fehérjék kinyerése a mintából,
- tisztítási lépések során a fehérjék visszaoldása,
- enzimes emésztés,
- jelölést alkalmazó módszerek esetében a jelölés.

Ezen lépések esetében mindig kiemelt figyelmet kell fordítani arra, hogy az adott lépések hatékonysága azonos legyen minden minta esetében.

Ahhoz, hogy valós mennyiségi analízist tudjunk végezni, kiemelten fontos, hogy **azonos** emésztett **peptidmennyiséget juttassunk be a tömegspektrométerbe** minden vizsgált

minta esetében. Ehhez megbízható és reprodukálható összfehérje/peptid kvantitálási módszer, megfelelő mintafelvitel és kromatográfiás áramlási rendszer szükséges.

Ugyanakkor az is nagyon fontos, hogy megfelelő számú **biológiai és technikai ismétlést** végezzünk. A biológiai variabilitás még sejt kultúrák esetében is jelentős, viszont állat- vagy humán minták esetében nagymértékű lehet. Többféle megközelítést lehet alkalmazni a variabilitás kezelésére: egyesek legalább 3 biológiai és legalább 2 technikai párhuzamos bevonásával, mások technikai párhuzamos bevonása nélkül, de kellően nagy számú donorból származó minta (biológiai párhuzamosok) analízisével próbálják kezelni a problémát. Mindenképp érdemes statisztikussal egyeztetni a kísérlettervezés során, mert amíg egy sejt kultúrák vizsgálat esetén elegendő lehet a 3 biológiai párhuzamos alkalmazása, addig a betegminták esetében több tíz, de lehetőség szerint minél több minta bevonása célszerű (*lásd Módszertervezési szempontok*).

Az adatfüggetlen módszerek alkalmazásától eltekintve, ahol az esetek nagy részében nem alkalmaznak technikai párhuzamosokat, a minimum két technikai párhuzamos alkalmazása javasolt. Ha van rá anyagi lehetőség és elegendő minta, akkor érdemes 3 vagy akár 4 technikai párhuzamost is alkalmazni. Ez abban az esetben lehet kiemelkedő jelentőségű, ha a biológiai párhuzamosok (minták) száma alacsony.

### Hibalehetőségek

A kvantitatív proteomika során leggyakrabban előforduló hibák a kísérlettervezéshez és tömegspektrométerbe bejuttatott eltérő fehérje/peptid mennyiséghez köthetők.

*Kísérlettervezés során gyakran felmerülő hibák:*

- csoportosítás és randomizálás hiánya,
- túl alacsony mintaszám.

*Eltérő fehérje/peptid mennyiség vizsgálatához vezető hibák:*

- a fehérjekinyerés és/vagy -emésztés ismételhetsége nem megfelelő,
- nem azonos összfehérje/peptid mennyiséget juttatunk be a tömegspektrométerbe az egyes minták vizsgálata során,
- az alkalmazott tömegspektrometriás módszer reprodukálhatósága nem megfelelő (eredhet hibás készülékbeállításból, elkoszolódott, nem megfelelően működő analitikai rendszer használatából vagy nem megfelelő módszerválasztásból).

### Eredmények kiértékelése

A kvantitatív proteomikai eredmények kiértékelése és a megfelelő következtetések levonása ugyanannyira fontos lépés, mint a minta előkészítése, a megfelelő módszerek kiválasztása és az analízisek pontos kivitelezése.

Igen intenzív viták és véleménykülönbségek láttak napvilágot a helyes kvantitatív proteomikai adatelemzést illetően. Tekintve, hogy az analízisek viszonylag széles lineáris dinamikus tartományban megbízhatóan működnek, és az eredmények széles értéktartományt ölelnek fel, érdemes a logaritmikus skálák használata az eredmények ábrázolásánál és kiértékelésénél.

Ami a statisztikai elemzést illeti, mindenképpen a statisztikusok által javasolt munkaflow-lyamatot szükséges alkalmazni: normalitás vizsgálat, az adatok eloszlásának megfelelő statisztikai próba kiválasztása (két csoport összehasonlításakor normál eloszlásnál t-teszt, nem normál eloszlásnál általában Mann–Whitney U teszt, több csoport összehasonlításakor

ANOVA) és az eredmények korrigálása, általában *Benjamini–Hochberg FDR korrekció* alkalmazásával.<sup>[14]</sup> Csak az FDR korrekció után szignifikáns változást mutató fehérjéket fogadhatjuk el, mint statisztikailag szignifikáns változást mutató fehérjék az egyes csoportok között, és ezekkel dolgozhatunk tovább, ezeket használhatjuk fel az eredmények komplex értelmezéséhez, és a biológiailag releváns következtetés levonásához.

### Ajánlott irodalom

1. Evers CE, Gaskell S (eds). Quantitative Proteomics, New Developments in Mass Spectrometry, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2014.
2. Bantscheff M, Schirle M. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 389:1017-31.
3. Bantscheff M, Lemeer S, Savitski MM, et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: Critical review update from 2007 to the present. *Anal Bioanal Chem.* 2012; 404:939-65.
4. Zhang L, Elias JE. Relative Protein Quantification Using Tandem Mass Tag Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2017; 1550:185-98.
5. Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, et al. Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics.* 2007; 7:340-50.
6. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2002; 1:376-86.
7. Snider J, Wang D, Bogenhagen DF, et al. Pulse SILAC Approaches to the Measurement of Cellular Dynamics. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1140:575-83.
8. Bogenhagen DF, Haley JD. Pulse-chase SILAC- based analyses reveal selective oversynthesis and rapid turnover of mitochondrial protein components of respiratory complexes. *J Biol Chem.* 2020; 295:2544-54.
9. Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, et al. Less label, more free: Approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics.* 2011;11:535–553
10. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 2008;26:1367-72.
11. Lange V, Picotti P, Domon B, et al. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol.* 2008; 4:222.
12. Peterson AC, Russell J D, Bailey DJ, et al. Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2012; 11:1475-88.
13. Ludwig C, Gillet L, Rosenberger G, et al. Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol.* 2018; 14:e8126.
14. Oberg AL, Vitek O. Statistical design of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments. *J Proteome Res.* 2009; 8:2144-56.
15. Burger B, Vaudel M, Barsnes H. Importance of Block Randomization When Designing Proteomics Experiments. *J Proteome Res.* 2021; 20:122-8.
16. Domon B, Aebersold R. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. *Nat Biotechnol.* 2010; 28:710-21.

## 9. FOSZFORILÁCIÓ VIZSGÁLATA

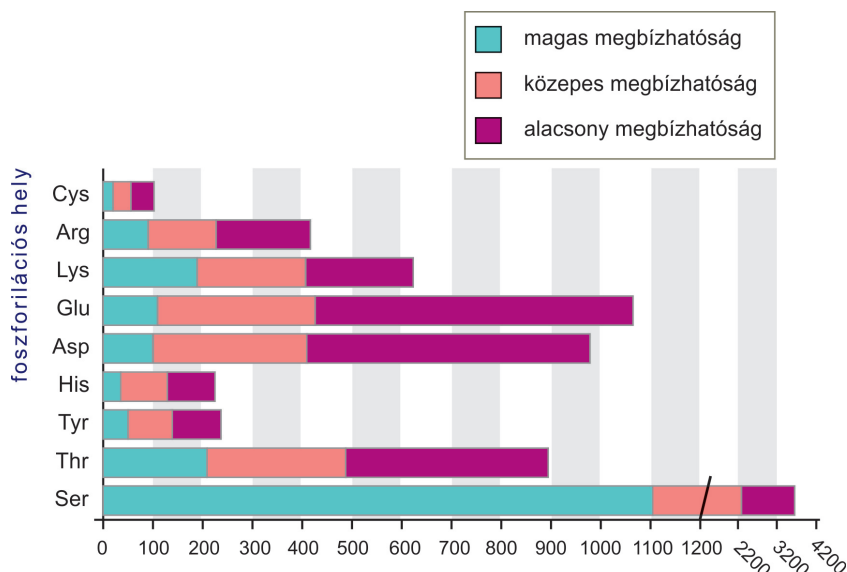
Tóth Gábor,  
Révész Ágnes,  
Drahos László,  
Turiák Lilla

### Bevezetés

A foszforiláció az egyik legdinamikusabb szabályozó szerepekkel rendelkező reverzibilis *poszttranszlációs módosulás (PTM)*, hiszen számos enzim és receptor aktiválásáért/inaktiválásáért felelős. Foszforiláció során foszfátcsoportok épülnek be kitüntetett aminosavak oldalláncaira észterkötés vagy amidkötés kialakítása közben.

*Kanonikus foszforilációs helyek* nevezzük azokat az aminosavakat, amelyek oldalláncaán foszfátészter-kötéssel alakulhat ki a foszforiláció. Ezek a szerin, treonin és a tirozin aminosavak. *Nem-kanonikus foszforilációs hely* pedig az ettől eltérő kötést kialakító aminosav, pl. foszfoamidát-kötéssel a hisztidin, a lizin és az arginin foszforilálódhat, foszfotionát-kötéssel a cisztein, míg foszfokarboxilát-kötéssel az aszparaginsav és a glutaminsav. Az egyes aminosavakon megjelenő foszforiláció gyakorisága széles tartományok között mozog, elsősorban a vizsgált minta típusától és a fiziológias állapottól függ. Míg a foszfoserinek általában a teljes populáció kb. 90–95%-át, a treonin néhány százalékát, a tirozin- és hisztidin- foszforiláció csupán néhány tizedszázalékát teszik ki az összes azonosított foszforilációs helyek **(9.1. ábra)**.<sup>[1]</sup>

Emögött több ok is húzódhat, például a tirozin foszforilációja nagyon dinamikus és rövid élettartamú, míg a hisztidin foszforilációja kifejezetten instabil, így nehéz megőrizni az izoláció során. Az alábbi fejezet a hidrox-aminosavak foszforilációját taglalja.



azonosított egyedi foszfopeptidek száma

**9.1. ábra.** Kanonikus és nem-kanonikus foszforilációs helyek gyakoriságának jellemzése HeLa sejtlizátumban azonosított foszfopeptidek száma alapján [Forrás: The EMBO Journal (2019) 38: e100847)]<sup>[1]</sup>

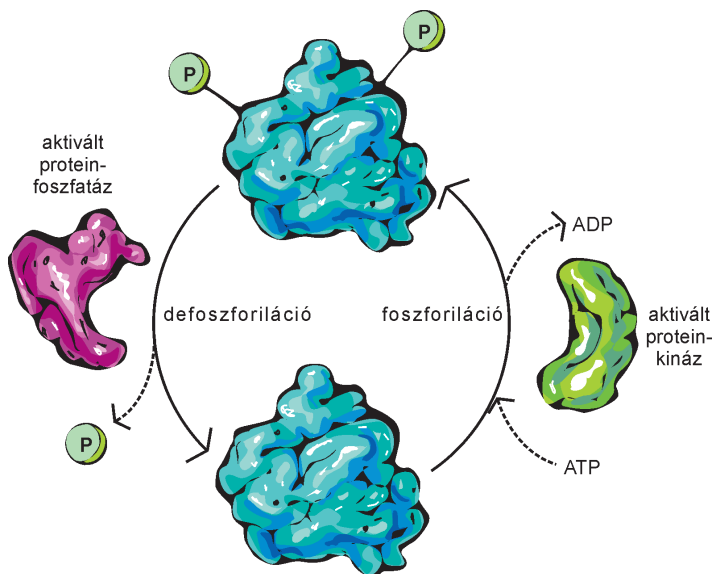


## A foszforiláció és jelentősége

A foszforilációs/defoszforilációs folyamatok széleskörű biológiai szereppel rendelkeznek, például szerepet játszanak a sejtek közötti jelátvitel és a fehérje-fehérje, fehérje-DNS, fehérje-RNS interakciók kialakításában és szabályozásában. Emellett jelentős hatásuk van a fehérjék szerkezetének kialakításában és enzimek katalitikus aktivitásának szabályozásában. Ezáltal fontos szereppel rendelkeznek a sejtek differenciálódása, proliferációja, a teljes sejtciklus szabályozása terén, így nem meglepő, hogy pl. autoimmun és tumoros megbetegedések esetén jelentős változás tapasztalható a foszforilációban.<sup>[2]</sup> Talán a legszélesebb körben ismert kapcsolat a foszforiláció és különböző megbetegedések között a neurodegeneratív betegségek (pl. Alzheimer-kór) során megváltozó foszforilációs folyamatok. Ezek közül a legjelentősebb a Tau fehérjék hiperfoszforilációja.<sup>[3-5]</sup>

A foszforilációs folyamatokat a *kináz* enzimek végzik. Aktiválódásuk olyan folyamatokat indít el, mely különböző aminosavak foszforilációjához vezet (9.2. ábra). A kinázok aktiválása és inaktiválása több módon történhet, pl. autofoszforiláción keresztül, aktivátor vagy inhibitor fehérjével való kötődés révén. A kinázok révén az emberi fehérjék kb. 30%-a módosulhat, így aktívan szabályozzák a legtöbb intracelluláris jelátviteli útvonalat. A kinázok csoportosítása az általuk foszforilált aminosavak alapján történik, így megkülönböztetünk szerin-treonin-kinázokat, tirozin-kinázokat, illetve a mindhárom aminosav esetén foszforiláló, ún. *duálspecifitású kinázokat*.<sup>[2]</sup> Itt jegyeznénk meg, hogy kb. 15 esztendővel ezelőtt azonosították az első „Golgi-lakó” kinázt, amely az extracelluláris térben előforduló foszforilációért felelős. Ezt a felfedezést több is követte, pl. a kazein módosításáért felelős fehérjét (FAM20C) 2012-ben azonosította a Dixon-csoport.<sup>[6]</sup> Ez azért is érdekes, mert a kazein volt a legelső fehérje, amin a foszforilációt felfedezték.

A kinázokkal ellentétes funkcióval rendelkező fehérjéket *foszfatázoknak* nevezzük. Feladatuk a foszoproteinekről a foszfátcsoportok eltávolítása hidrolízissel, mely eredményeként egy foszfátcsoport és egy szabad hidroxilcsoport képződik. A foszfatázok a kinázoknál gyorsabb kinetikával rendelkeznek. A proteomikai minta-előkészítés (lásd 3. fejezet) során a



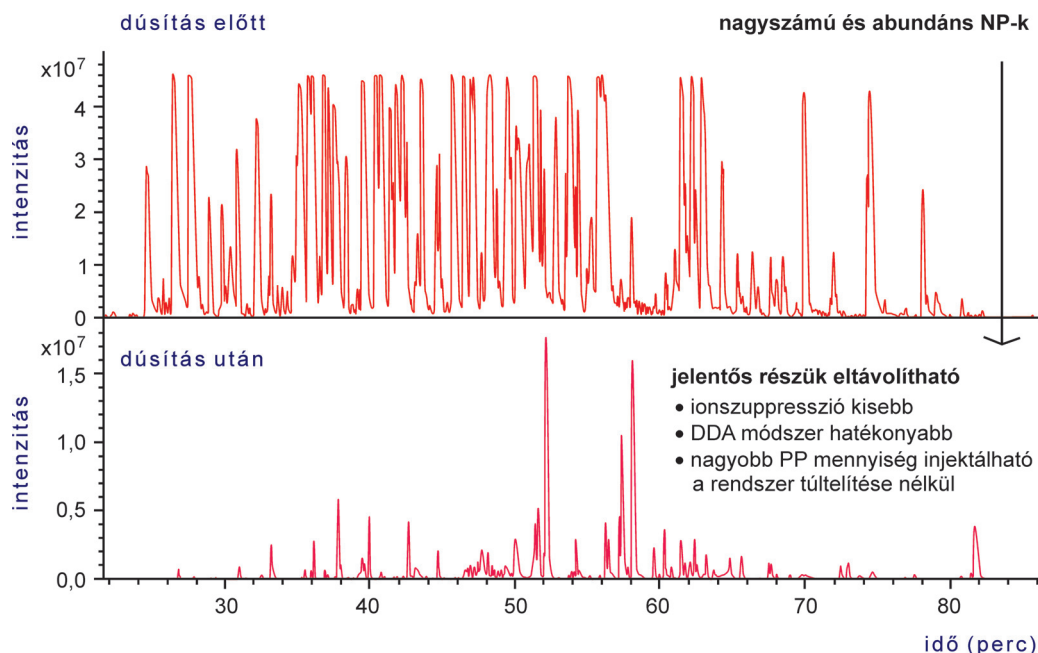
9.2. ábra. A foszforiláció/defoszforiláció folyamata

denaturálási lépésben vagy enziminhibitorok hatására a foszfatázok aktivitása csökken (ideális esetben inaktiválódnak), így a minta foszforilációja minimális változásokkal (ideális esetben változatlanul) vizsgálható. Azonban foszfatáz inhibitorok jelenlétében is gyorsan kell dolgozni, mert teljesen nem inaktiválják a foszfatázokat. A foszfatázokról fontos biológiai szerepük ellenére sokkal kevesebbet tudunk, ennek egyik oka az lehet, hogy eltérő szerkezetük miatt nehezebben azonosíthatóak.<sup>[2]</sup>

### Vizsgálati módszerek, a dúsítás és a frakcionálás

A foszforilációs helyek vizsgálatának tradicionális módszerei közé tartozik a különböző antitestek alkalmazása immunhisztokémiai módszerekkel. A modern, nagy áteresztőképességű vizsgálatokhoz azonban elengedhetetlen a tömegspektrometriás módszerek alkalmazása. A foszforilált fehérjék *bottom up* vizsgálata során a belőlük képződő foszopeptidek (PP-k), azaz a betöltött foszforilációs helyek relatíve kisebb mennyiségben vannak jelen a nemfoszforilált peptidekhez (NP-k) képest. Ez az ionizáció során jelentős ionelnyomást okozhat emellett, hogy a foszfátcsoport pozitív ionizációs mód alkalmazása esetén egyébként is csökkenti a peptidek/fehérjék ionizációs hatásfokát. Emellett a leggyakrabban alkalmazott adatfüggő elemzési módszer (DDA) során is nagyobb valószínűséggel kerülnek kiválasztásra a nagyobb mennyiségben jelen lévő (nemfoszforilált) peptidek. A fent említett okok miatt a HPLC-MS mérések előtt szükséges a minták foszopeptid-tartalmának dúsítása (9.3. ábra).

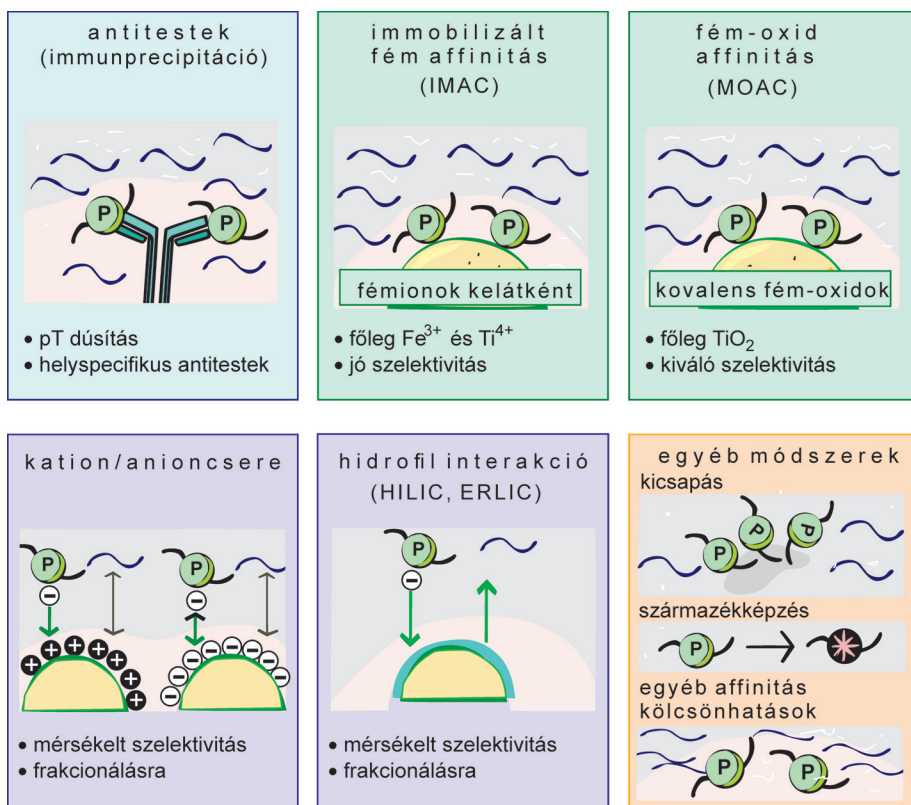
A folyamat során a vizsgálni kívánt komponensek (foszopeptidek vagy foszforilált fehérjék) részhányadát növeljük a mintában, általában olyan módon, hogy eltávolítjuk a vizs-



**9.3. ábra.** HeLa sejtizrátumból származó triptikus peptidkeverékek mérése során felvett kromatogramok. A dúsítás nélküli mintában jelentős a nemfoszforilált peptidek (NP-k) darabszáma és mennyisége is, míg dúsítással ez az arány akár meg is fordítható

gálni nem kívánt komponenseket (nemfoszforilált peptidek vagy fehérjék). A dúsítás a foszfo-proteomikai munkafolyamatok hatékonyságát alapjaiban határozza meg, így a fejezet során ezzel fogunk a legrészletesebben foglalkozni. A dúsítás történhet fehérje- vagy peptidszinten, az utóbbi jóval elterjedtebb a szakirodalomban. A dúsítást leggyakrabban „offline” módszerekkel végzik, azonban megfelelő HPLC készülékkel megvalósítható online módon is. Dúsítást végezhetünk fém-oxidokkal (metal oxide affinity chromatography, MOAC), gyan-tába immobilizált fémion (immobilized metal affinity chromatography, IMAC) állófázisok alkalmazásával, HPLC elválasztás során a frakciók legyűjtésével, valamint specifikus antitestek segítségével.<sup>[7]</sup> Emellett további, ritkábban alkalmazott módszerek a  $\text{Ca}^{2+}$ -ionokkal történő kicsapás, a foszfátcsoportok származékképzése és egyéb folyamatosan fejlesztés alatt álló affinitásanyagok alkalmazása (9.4. ábra).

Általános elv, hogy a specifikusabb kötődést biztosító anyagokat (antitestek, IMAC, MOAC) dúsításra, míg a kevésbé specifikus állófázisokat (ioncserélők, HILIC állófázis) kromatográfiás elválasztással megvalósított frakcionálásra alkalmazzuk. Az affinitás dúsítások és a frakcionálási eljárások alapvető jellemzőinek összehasonlítása az 9.1. táblázatban látható.



9.4. ábra. Dúsítási megközelítések csoportosítása, általános formáik

**9.1. táblázat. Dúsítási és frakcionálási módszerek általános tulajdonságainak összehasonlítása**

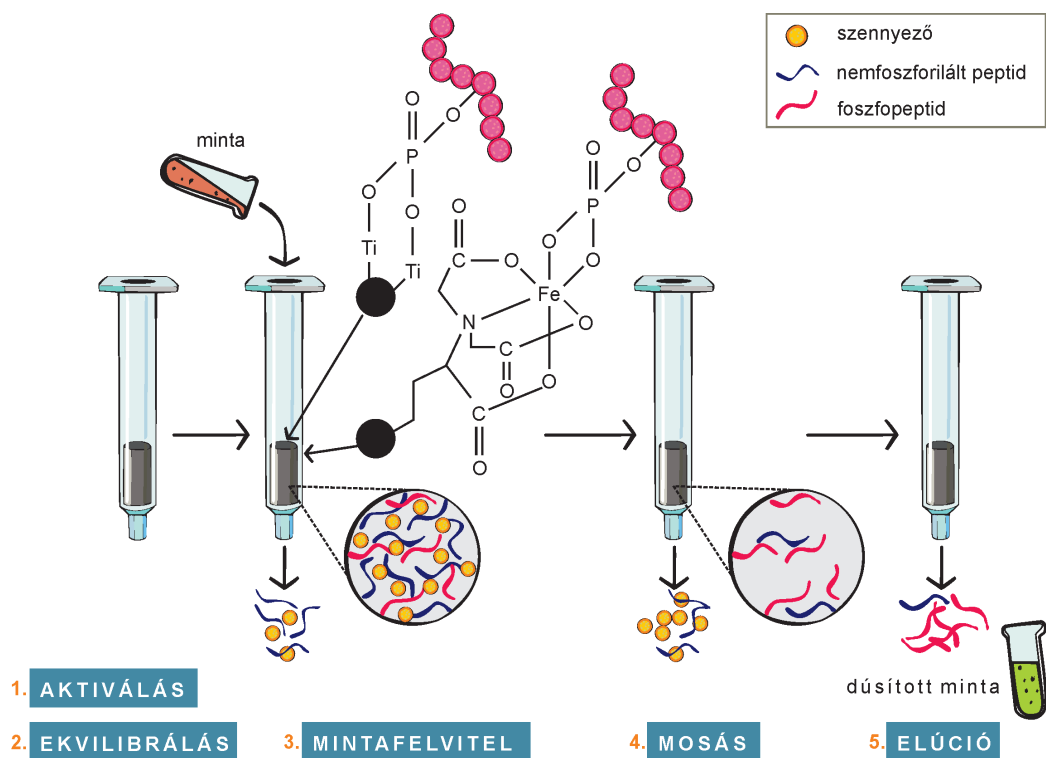
	<b>Affinitás dúsítások</b>	<b>Frakcionálás</b>
<b>Állófázis</b>	Multivalens fémek oxidjai Gyantába ágyazott fémionok	Kation- és anioncserélők HILIC
<b>Megvalósítás általános módja</b>	Szilárd fázisú extrakció (SPE) Offline gyakoribb, de online is lehet	Online és offline kromatográfiás elválasztás, offline elektroforézis
<b>Alkalmazott kölcsönhatások</b>	Lewis sav-bázis kölcsönhatás	Elektrosztatikus és hidrofíli interakciós kölcsönhatások
<b>Szelektivitás</b>	Nagy szelektivitás foszfopeptidekre, akár foszforilációs helyre is	Mérsékelt szelektivitás
<b>Dúsítás szintje</b>	Peptid	Peptid és fehérje
<b>Előnyök</b>	Nagy dúsítási hatékonyság Automatizálható	Robusztus Automatizálható
<b>Hátrányok</b>	Gyakran nem MS-kompatibilis oldószerek Jelentős érzékenység a minta eredetére és mennyiségére	Mérési idő sokszorozódása Mérsékelt dúsítási hatékonyság

**Affinitás dúsítások**

Az affinitás dúsítások a foszfátcsoportok nemkötő elektronpárjai és multivalens fémionok betöltetlen d-pályái között kialakuló kölcsönhatásokon alapulnak. Az állófázis mintafelvitel során Lewis-savként viselkedik, így a foszfátcsoportok elektrontöbbletét fogadni képes, erős másodrendű kölcsönhatásokat eredményezve. A kölcsönhatások erőssége miatt elsősorban peptidszintű dúsításra alkalmasak, a túl sok foszfátcsoport ugyanis permanens kötődést idéz elő az állófázison. A kialakuló másodrendű kölcsönhatások viszonylag specifikusnak tekinthetők, elsősorban a poláris oldalláncot tartalmazó és glikozilált (főleg szializált) peptidek jelenhetnek meg szennyezőként. Fontos azonban leszögezni, hogy még tökéletesen optimalizált módszerekkel sem lehetséges teljes mértékben eltávolítani a nemfoszforilált peptideket, azonban a foszfopeptidek részhányadának jelentős (akár néhány százszoros) növelése megvalósítható, így növelve detektálhatóságukat.

„Offline” és „online” alkalmazások során egyaránt a szilárd fázisú extrakció (SPE) elve a legelterjedtebb. Az SPE során a mintát egy megfelelő, gyenge eluenserősségű oldatban (lásd következő két alfejezet) felvisszük az állófázisra. A vizsgálni kívánt komponensek megkötődnek az állófázison, míg az egyéb komponensek a felvitel és a mosási ciklusok során eltávolíthatók.<sup>[8]</sup> Ezután az elúciós lépésben a megkötődött komponensek leoldhatók az SPE oszlop-  
ról (9.5. ábra).

Hasonló elven alapul a mágneses gyöngyök alkalmazása. Ebben az esetben az állófázisként alkalmazott részecskék magját egy mágneses anyag, általában vas-oxidok adják, amit a dúsításhoz alkalmazni kívánt vegyületekkel vonnak be. A mintafelvitel során a mintát és a mágneses gyöngyöket egy eppendorf csőbe helyezzük, és rázatás mellett inkubáljuk. Ezután a gyöngyöket egy mágnes segítségével az eppendorf cső aljára vagy falára rögzítjük, és a



9.5. ábra. Az affinitás dúsítások munkafolyamata

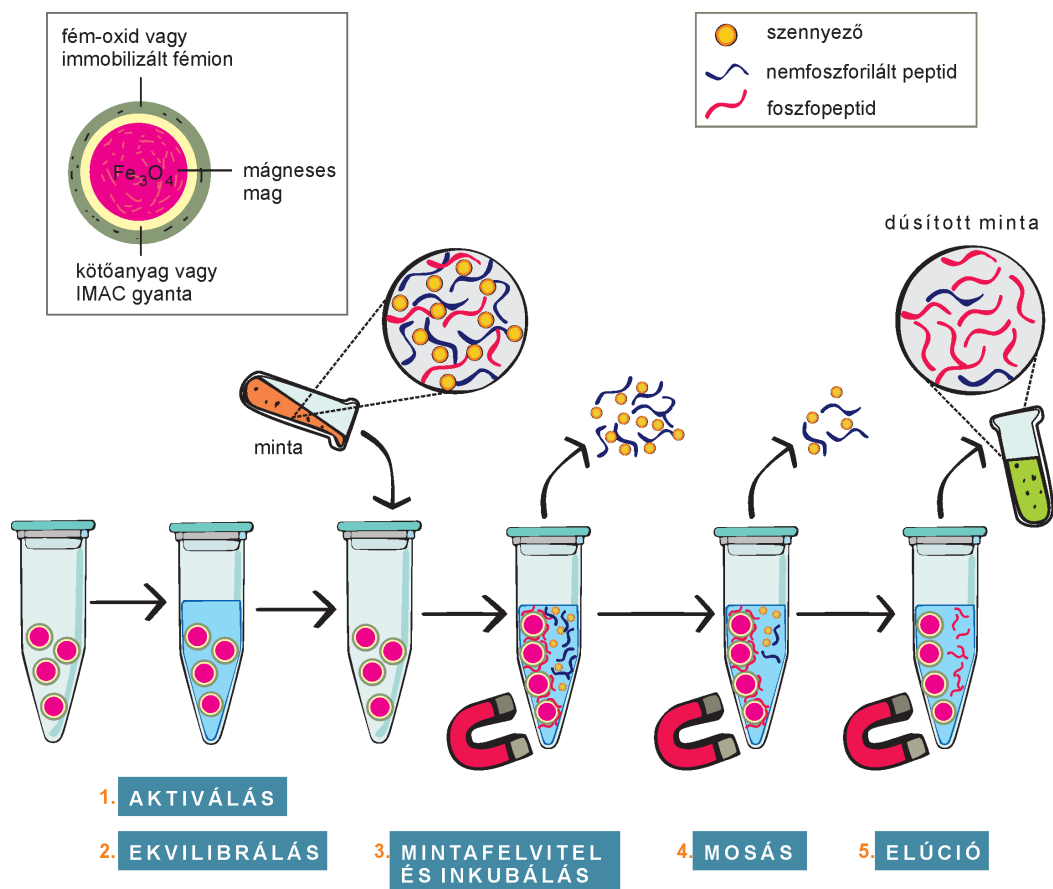
felviteli oldatot lepipettázzuk. Ezt a mosási oldatokkal történő inkubálás követi, és az előzőhöz hasonló módon az oldatot lepipettázzuk. Majd az elúciós oldattal történő inkubáció után a dúsított minták kipipettázhatók az eppendorf csőből.<sup>[9]</sup> A mágneses gyöngyöket alkalmazó módszertan általános bemutatása a 9.6. ábrán látható.

## Fém-oxid affinitás kromatográfia (MOAC)

### ■ Állófázisok

A fém-oxid kromatográfiához leggyakrabban alkalmazott állófázis a titán-dioxid ( $\text{TiO}_2$ ). Olcsó, könnyen hozzáférhető, és széleskörű alkalmazása miatt számos irodalmi protokoll áll rendelkezésre. A  $\text{TiO}_2$  előállítása során az állófázis morfológiájának széleskörű változtatására van lehetőség, amellyel a kapacitás, de akár a szelektivitás is befolyásolható. További előnye, hogy a foszfopeptidekkel közepesen erős kötéseket alakít ki, így akár a többszörösen foszforilált komponensek elúciója is megvalósítható. Kismértékű szelektivitást mutat a szerin-foszforilált (pS) és egyszeresen foszforilált peptidekre, azonban teljes specificitásról nem beszélhetünk.

Ezzel szemben, a második leggyakrabban alkalmazott cirkónium-dioxid ( $\text{ZrO}_2$ ) esetén a kialakított kölcsönhatások jóval erősebbek a  $\text{TiO}_2$ -hoz képest, így ez jelentős szelektivitást mutat az egyszeresen foszforilált peptidekre (ugyanis a többszörösen foszforilált peptidek nehezen eluálhatók az állófázisról). További állófázisok is rendelkezésre állnak mint például az



9.6. ábra. A mágneses gyöngyökkel végzett dúsítási folyamat

alumínium-hidroxid vagy alumínium-oxid gyöngyök alkalmazása, valamint a vas-oxid alapú állófázisok, amelyek a mágneses gyöngyök alkalmazása miatt lehetnek fontosak. Ezenkívül található még irodalmi példa nióbium-oxid, hafnium-oxid, valamint tallium-oxid alapú állófázisok alkalmazására is.<sup>[10-12]</sup>

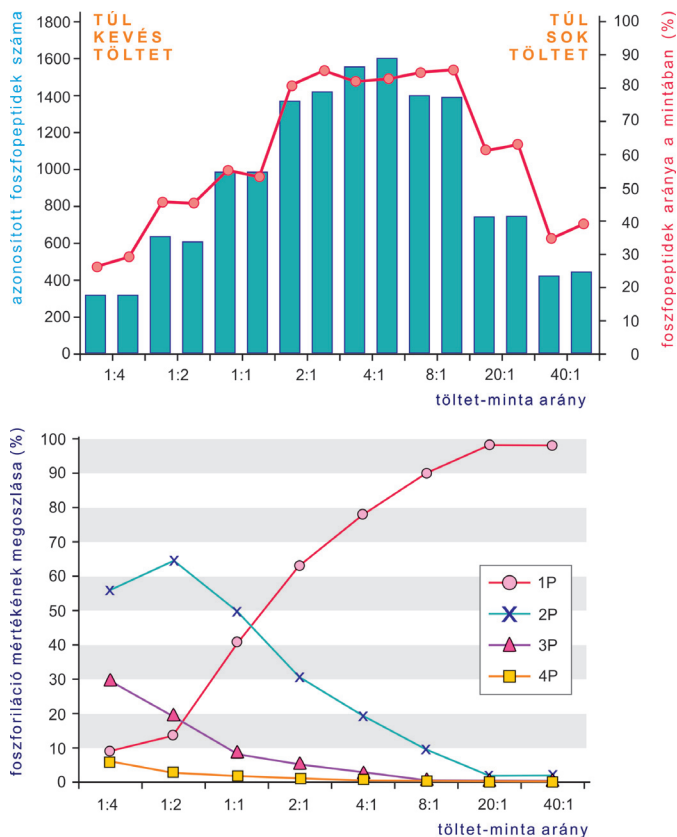
### ■ Felviteli és elúciós pufferek

A fém-oxid alapú állófázisokkal megvalósított dúsítások hatékonyságát alapvetően befolyásolja a módszer során alkalmazott felviteli és elúciós pufferek összetétele. A felvitel során elsődlegesen két célt szükséges szem előtt tartanunk. Az első cél, hogy a lehető legtöbb foszfopeptid kötődjön meg az állófázison, a második cél pedig, hogy a lehető legkevesebb nemfoszforilált peptid kötődjön meg. Ehhez az szükséges, hogy a foszfopeptidek deprotonált formában legyenek, míg a nemfoszforilált peptidek lehető legnagyobb részhányada protonált formában legyen. Ezt megfelelő pH-jú savas közeg biztosításával, általában 0,1–5% koncentrációjú trifluorecetsav (TFA) alkalmazásával célszerű megvalósítani, azonban hangyasav és ecetsav alkalmazása is lehetséges. A nemfoszforilált peptidek kötődését az

úgynevezett kiszorító ágensek használatával minimalizálhatjuk. A kiszorító ágensek feladata, hogy a szabadon maradt kötőhelyeket blokkolják, ezáltal csökkentve a nem foszforilált peptidok kötődésének valószínűségét. Tehát olyan molekulák alkalmazására van szükség, amelyeknek a savi disszociációs állandója ( $pK_a$ ) a dúsítani kívánt foszfopeptidek és az eltávolítani kívánt nemfoszforilált peptidok  $pK_a$ -értéke közé esik. A legáltalánosabban alkalmazott kiszorító ágensek a hidroxisavak, mint például a 2,5-dihidroxibenzoésav, a tejsav, a citromsav, a fahéjsav, de gyakran alkalmaznak például glicerint is. A savkoncentráció (pH) és a kiszorító ágens koncentrációjának beállítása kiemelt fontosságú a módszer hatékonyságára és szelektivitására nézve. Az oszlop holtterefogatában maradt peptidok és a nem specifikusan kötődött molekulák eltávolítására használt mosó puffer általában megegyezik a felviteli pufferrel. Az elúció során célunk a korábban kialakított Lewis sav-bázis kölcsönhatások megszüntetése, így az elúciót bázikus kémhatású oldószerekkel valósítjuk meg. Az elúciós oldószert tartalmazhat szervetlen bázist (pl. 1–10% ammónia) és szerves bázist (pl. 0,1% piperidin) is, azonban figyelni kell az oldószerek, adalékanyagok MS-kompatibilitására.

### ■ Hatékonyságot és szelektivitást befolyásoló tényezők

A MOAC módszerek hatékonyságát és szelektivitását számos paraméter erőteljesen befolyásolja, így gondos optimalizálást kell végezni a módszer rutinszerű alkalmazása előtt. Alapvetően határozza meg ezen tulajdonságokat az alkalmazott állófázis morfológiája, valamint az alkalmazott töltet és minta mennyiségének aránya. Túl kevés töltet alkalmazása esetén a töltet kis kapacitása miatt nem tud megkötődni a mintában található összes foszfopeptid, míg túl sok töltet alkalmazása esetén nem valósítható meg az elvárt mértékű elúció (9.7. ábra). Emellett jelentősen befolyásolják a dúsítás hatékonyságát a mintában található mátrix komponensek, ugyanis megváltoztathatják a felviteli puffer kémhatását és a nonspecifikus kötődések tulajdonságait is. Ezenkívül természetesen a felviteli puffer-



**9.7. ábra.** A töltet–minta arány hatása az azonosított foszfopeptidek számára, a dúsítás hatásfokára (foszfopeptidek aránya a mintában) és a szelektivitásra (foszforiláció mértékének megoszlása). Látható, hogy az optimális töltet-minta arány felett csökken az azonosított foszfopeptidek száma, arányuk a mintában és emellett eltolódik a szelektivitás az egyszerűen foszforilált peptidok (1P) irányába. =Forrás: J. Proteome Res. 2009, 8, 11, 5375–5381. Copyright 2009 American Chemical Society<sup>[13]</sup>



ben alkalmazott vegyületek és azok koncentrációja is jelentős hatással bír. A MOAC módszerek elsősorban egyszerűen és kétszeresen foszforilált peptidok dúsítására alkalmasak.

### Immobilizált fém affinitás kromatográfia (IMAC)

Az IMAC módszerek alapelve megegyezik a MOAC módszerekével.

#### ■ Állófázisok

A tradicionális IMAC módszerek esetén a fémionok egy iminodiacetsav (IDA) vagy nitrilodiacetsav (NTA) alapú gyantába kelátként ágyazva helyezkednek el, azonban napjainkban egyre gyakoribb a különböző foszfónátok alkalmazása, különösen szilikagél alapú állófázisok esetén. Az alkalmazott fémionok leggyakrabban  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Zr}^{4+}$ ,  $\text{Ti}^{4+}$ , azonban kiemelkedő változatosság tapasztalható a hordozók kialakításában kereskedelmi forgalomban kapható és laborban készített állófázisok esetén egyaránt.

#### ■ Felviteli és elúciós pufferek

A minták felvitele savas közegben történik, legáltalánosabban TFA, sósav, hangyasav vagy ecetsav alkalmazásával. IMAC módszerek esetén nem alkalmazunk kiszorító ágenseket, azonban az ionerősség beállítása (pl. NaCl segítségével) elengedhetetlen az állófázis megfelelő állapotban tartásához. A kötődés a MOAC módszerekhez hasonlóan Lewis sav-bázis kölcsönhatáson alapul. A mosási lépés során a felviteli puffer további adagolásával eltávolítjuk a nemspecifikusan kötődött peptidokat. Az elúciós lehetőségek IMAC esetén nagyobb változatosságot mutatnak. A legegyszerűbb lehetőség ebben az esetben is magas pH-jú oldatok (általában ammónia) segítségével megszüntetni az állófázis Lewis-sav karakterét, ezáltal csökkenteni a kölcsönhatások erősségét. Emellett gyakori a foszfopeptidek leszorítása is az oszlopról, amelyet elsősorban nagy koncentrációjú TFA-val, foszforsavval vagy foszfátsókkal (pl. ammónium-dihidrogénfoszfát) tehetünk meg. A gyakorlatban általában a fenti módszerek többlépéses kombinációját valósítják meg a foszfopeptidek teljeskörű elúciója érdekében.

#### ■ Hatékonyságot befolyásoló tényezők

Az IMAC módszerek hatékonyságát és szelektivitását szintén számos paraméter befolyásolja, így ebben az esetben is gondos optimalizálást kell végezni rutinszerű alkalmazás előtt. Alapvető fontosságú a megfelelő fémion és a hordozó kiválasztása és a töltetmennyiség is. Kiindulási alapnak érdemes a legelterjedtebb  $\text{Fe}^{3+}$ -IMAC módszereket alkalmazni. Emellett, a MOAC-hoz hasonlóan, jelentősen befolyásolják a dúsítás hatékonyságát a mintában található mátrix komponensek, melyeknek hatását a felviteli pufferben alkalmazott vegyületek és azok koncentrációjának alapos optimalizálásával ellensúlyozni lehet. Az IMAC módszerek általánosságban nagyobb kapacitással rendelkeznek a MOAC módszerekhez képest, a dúsítás mértéke és specifikussága azonban jóval alacsonyabb. Emiatt az IMAC módszerekkel dúsított minták általában jóval több savas karakterű nemfoszforilált peptidet tartalmaznak. Ez az alacsonyabb specifitás elsősorban a gyengébb kölcsönhatásoknak köszönhető, amely azonban lehetővé teszi a többszörösen foszforilált komponensek elúcióját is az oszlopról. Ezért ha többszörösen foszforilált peptidok dúsítása a cél, egyértelműen az IMAC módszerek alkalmazása javasolt.

## Frakcionálási eljárások

A frakcionálás elsődleges célja a minta komplexitásának csökkentése. A mintákat adott fizikai-kémiai tulajdonságaik alapján több részletre, ún. frakcióra bontjuk. Ezután ezeket a frakciókat külön-külön mérjük le, ezáltal csökkentve a mérendő minta komplexitását. A mérési adatokat utólag egyesítve jelentősen növelhetjük a proteom lefedettségét, ahhoz képest, mintha egy „frakcióként” mértük volna le a mintát. A módszer hátránya természetesen a többszörösére növekedett mérési idő, és hogy az affinitás dúsításokhoz képest jóval kisebb szelektivitással bír az egyes poszttranszlációs módosítások esetén. Általánosságban véve a frakcionálást célszerű a HPLC-MS mérésekre nézve minél ortogonálisabb módszerrel végezni. Ezen témakör részletezésétől ebben a fejezetben eltekintünk, az érdeklődő olvasó figyelmébe ajánljuk a vonatkozó szakirodalmat (például <sup>[14]</sup>) és a 4. fejezetet. A foszforilációs mérések elvégzése során a frakcionálással a célunk foszforilált fehérjékben vagy peptidekben gazdag frakciók és nemfoszforilált molekulákban gazdag frakciók létrehozása és elkülönítése. Ezután célzottan azon frakciók vizsgálhatók a HPLC-MS analízisek során, amelyekben a foszforilációt hordozó molekulák feldúsultak. A mintákat *fehérjeszinten* frakcionálhatjuk elektroforetikus technikákkal (pl. SDS-PAGE, izoelektromos fókuszálás), valamint ioncserés (IEC) és méretkizárásos (SEC) kromatográfia alkalmazásával. *Peptidszintű frakcionálására* számos módszer áll rendelkezésre, például az ioncserés kromatográfia, a hidrofil interakciós kromatográfia (HILIC) és az elektrosztatikus taszításon alapuló hidrofil interakciós kromatográfia (ERLIC). Foszfopeptidek dúsítására irányuló frakcionálások esetén kevésbé elterjedt módszerek még a magas pH-jú fordított fázisú kromatográfia és a grafitalapú elválasztások. Jelen fejezetben csak a leggyakrabban alkalmazott módszerek (peptidszintű IEC, HILIC és ERLIC kromatográfia) részleteit tárgyaljuk. A módszerek részletesebb megismeréséhez ajánljuk a 4. fejezetre való visszatekintést.

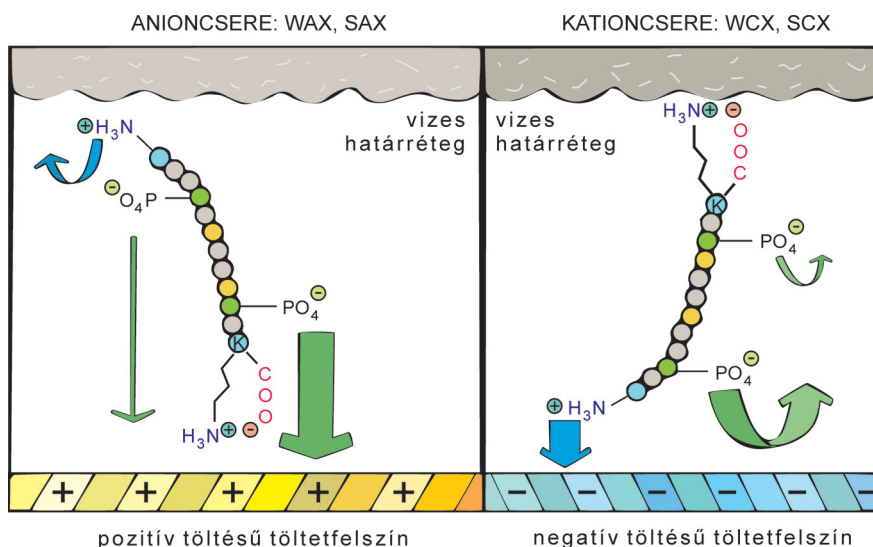
### ■ Frakcionálás ioncserés kromatográfiával

Ioncserés módszerek tárgykörében megkülönböztetünk gyenge és erős ioncserélő állófázisokat. *Erős ioncserélők* esetén a retenciós funkciót betöltő csoportok erős savak/bázisok, így a töltetfelszín a teljes alkalmazható pH-tartományban ionizált. *Gyenge ioncserélők* esetén a retenciós funkciót betöltő csoportok gyenge savak/bázisok, így a töltetfelszín egy szűkebb pH-tartományban ionizált. Ez a pH-függő ionizáltsági állapot elsősorban hátránynak tűnhet, azonban a valóságban az extraszelektivitás lehetőségét hordozza magában. Ugyanis az oldószer-összetétel és a pH változásával akár az eredeti ioncserés körülmények részleges megszűnését is előidézhetjük a kromatográfiás futás közben. Pozitív töltésű töltetfelszín esetén anioncseréről (WAX és SAX), negatív töltésű töltetfelszín esetén kationcseréről (WCX és SCX) beszélünk.

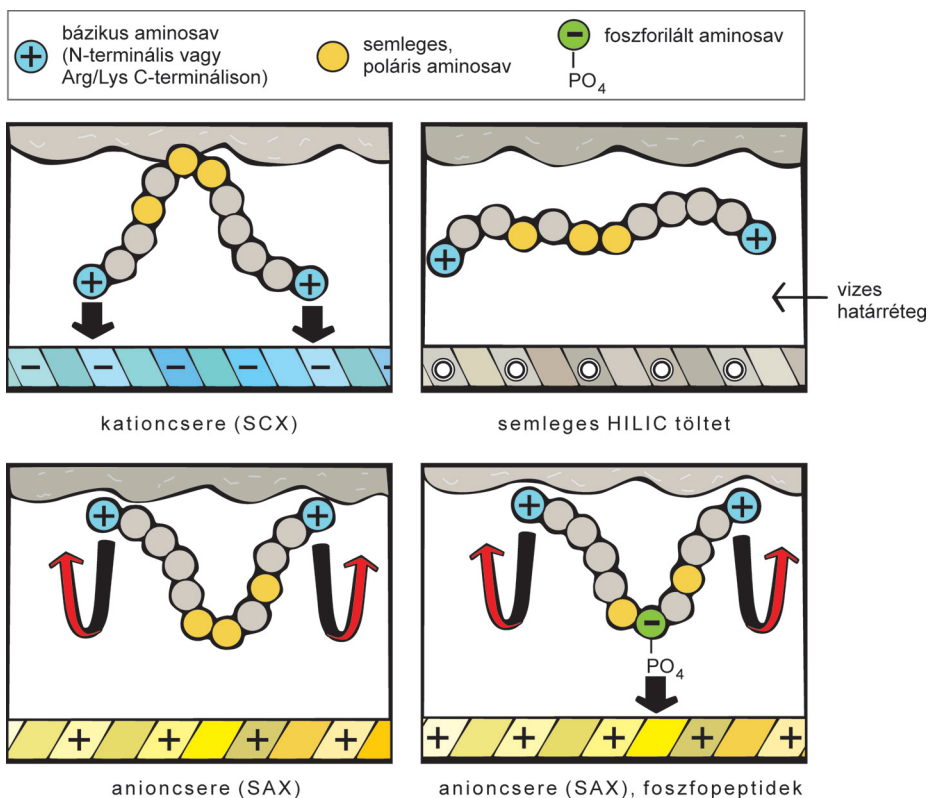
Anioncsere esetén a pozitív töltésű állófázis és a peptidek negatív töltésű funkciós csoportjai (foszfátcsoport, glikopeptidek szíalsav csoportja és C-terminális) között vonzó kölcsönhatás alakul ki. Ezzel szemben az állófázis taszítja az N-terminális és a nettó pozitív töltésű peptideket. Ezzel ellentétes a kationcsere mechanizmusa, ahol a foszfátcsoporttal rendelkező peptideket taszítja az állófázis (9.8. ábra). Így anioncsere esetén a nagyobb retencióval rendelkező frakciókban dúsulhatnak a foszfopeptidek, míg kationcsere esetén a korábban eluálódó frakciókban fognak dúsulni.<sup>[15]</sup>

### ■ Frakcionálás hidrofil interakciós kromatográfiával

A hidrofil interakciós kromatográfia (HILIC) során a töltet felszínén kialakuló vízben gazdag határréteg és a szerves oldószerben gazdag mozgófázis között alakul ki egy megosz-



**9.8. ábra.** Anioncserélő és kationcserélő tölteteken kialakuló kölcsönhatások. A nyilak szélességének változása utal a kölcsönhatás erősségére [Forrás: Anal Chem 2010 82 (12), 5253-5259. Copyright 2010 American Chemical Society]<sup>[15]</sup>



**9.9. ábra.** HILIC-alapú elválasztások során létrejövő kölcsönhatások a (foszfo)peptidek és az állófázis között. Az állófázis töltésállapota jelentősen módosíthatja a vizes határretegben kialakuló megoszlási tulajdonságokat [Forrás: Anal. Chem. 2008, 80, 1, 62–76. Copyright 2008 American Chemical Society]<sup>[16]</sup>

lási egyensúly a molekulák hidrofíliájának alapján (*részletesebben lásd 4. fejezet*). A módszer alkalmazhatóságát foszfopeptidekben dús frakciók létrehozására az teszi lehetővé, hogy a foszfátcsoport(ok) jelenléte jelentősen megnöveli a peptid hidrofíliáját. Ezáltal egy foszfopeptid retenciója nagyobb, mint az azonos szekvenciájú nemfoszforilált peptidé.

A HILIC kromatográfia egy speciális fajtája az ERLIC.<sup>[16]</sup> Ebben az esetben jelentős ioncserés karakterrel rendelkező HILIC fázist vagy HILIC oldószerrendszerrel üzemeltetett ioncserés kolonnát használunk a frakcionáláshoz. Ezáltal a normál HILIC elválasztásokhoz képest extraszelektivitás nyerhető a HILIC és ioncserés kölcsönhatások kombinációjával. Kationcserélő tulajdonsággal rendelkező oszlop a bázikus szekvenciareszletekre vonzó kölcsönhatást, míg a foszforilált szekvenciareszletekre taszító kölcsönhatást fejt ki. Anioncseres esetén pedig ennek fordítottja igaz, az állófázis taszítja a bázikus csoportokat, míg a foszforilált peptid esetén erősebb vonzó kölcsönhatás tapasztalható (**9.9. ábra**). Így kationcserés ERLIC esetén a korábban eluálódó frakciókban dúsulnak a foszfopeptidok, míg anioncserés ERLIC esetén a retenciós ablak végén találhatók a foszfopeptidok dús frakciói. A fejezetben részletezett frakcionálási módszerek közül az ERLIC alkalmazásával érhető el a legnagyobb hatékonyságnövekedés foszfopeptidok vizsgálatában.

### Tömegspektrometriás vizsgálati lehetőségek

A foszforiláció vizsgálata mérés-technikai szempontból hasonlít a tipikus proteomikai eljárásokhoz. Megközelítés tekintetében a *bottom up* vizsgálatok az elterjedtek, elsősorban a „top down” technika vizsgálati és adatértékelési nehézségei miatt.<sup>[17]</sup> A peptidok/fehérjék azonosításáról és kvantitatív vizsgálatának lehetőségeiről 7. és 8. fejezetekben találhatók további részletek.

#### ■ Ionizáció

Foszfopeptidok vizsgálatára a peptidokhoz hasonlóan a lágy ionizációs technikák használatosak. Nagy teljesítőképességéből adódóan komplex biológiai minták vizsgálatára a legelterjedtebb a nanoUHPLC-MS/MS alkalmazása ESI ionizációval. A MALDI ionizáció alkalmazása egyszerűbb, néhány foszforilált fehérjét tartalmazó minták esetén elterjedt, pl. a tejben található kazeinek elemzése során alkalmazzák gyakran. Mivel a foszfátcsoport kisméretű PTM, a pozitív ionizáció alkalmazása az elterjedt (a nemfoszforilált peptidokhoz hasonlóan). Azonban a foszfátcsoport jelenléte csökkenti az ionizációs hatásfokot, így nehezítve a foszfopeptidok analízisét.

#### ■ Fragmentáció

Az alkalmazott felvételi és fragmentációs módok általában a standard proteomikai módszerekkel megegyeznek, magukban hordozva az előnyöket és a hátrányokat is. Kiemelkedő a fragmentációs technikák (*lásd 7. fejezet*) közül az ütközésindukált disszociáció (CID) és az elektronbefogásos technikák (ETD/ECD), melyeket az alábbiakban hasonlítunk össze a foszfopeptidok vizsgálatában.

A CID a legelterjedtebb fragmentációs technika, viszonylag gyors fragmentációs reakciók során *b* és *y* típusú ionok keletkeznek (*lásd 7. fejezet*). Hátránya a módszernek, hogy a foszfátészterkötések jóval labilisabbak a peptidváz amidkötéseinél, így igen gyakori a fragmentációval egyidejű foszfátvesztés, nehezítve ezzel a foszfopeptidok és foszforilációs helyek azonosítását. A foszfátvesztés több különböző mechanizmus alapján is lejátszódhat. Leggyakoribb S és T foszforilációs helyek esetén az orto-foszforsav semleges vesztese (98 *m/z* eltolódás), mely S<sub>N</sub>2 mechanizmus alapján játszódik le oxazolin képzéssel. S, T és Y amino-

savak esetén megjelenhet metafoszforsav semleges vesztes is, ami 80  $m/z$  eltolódást eredményez. A metafoszforsav vesztesét gyakran követi vízvesztés is, ami így szintén 98  $m/z$  eltolódást eredményez. A foszfátvesztés mértékét elsősorban a peptidszekvencia és a protonmobilitás befolyásolja. Részletesebb mechanisztikus értelmezést kereső olvasók figyelmébe ajánljuk az alábbi két publikációt.<sup>[18,19]</sup>

Elektronbefogásos technikák (lásd 7. fejezet) alkalmazása során ezzel szemben az elektrontöbbség a peptidvázon lokalizálódik, így csökkentve annak stabilitását. Ezáltal c- és z'-típusú ionok keletkezése során maximalizálható a peptidlánc fragmentációja és minimalizálható a foszfátvesztés. Hátránya ezen módszereknek azonban, hogy jóval lassabbak a fragmentációs reakciók, ezáltal csökken az MS/MS mérésekkel azonosítható komponensek száma. Ennek kiküszöbölésére Orbitrap típusú készülékek esetén alkalmazható az elektronbefogásos és ütközés aktivált technikák kombinációja, az EThcD. Így az azonosított komponensek száma jelentősen növelhető az ETD-hez képest, de mégis elmarad a CID technikával azonosítható komponensek számától, azonban a helymeghatározás megbízhatóbb.<sup>[18]</sup>

### Alkalmazott készüléktípusok

Még a fent részletezett dúsítási módszerek alkalmazásával is számos kis relatív mennyiségű (intenzitású) foszfopeptid található a vizsgálni kívánt mintákban. Emiatt a szakirodalomban az igen érzékeny Orbitrap készülékek terjedtek el leginkább a HPLC-MS/MS mérésekhez. Az Orbitrap készülékek további előnye a nagy felbontás és a többféle fragmentációs technika megbízható együttes alkalmazása, amely kompenzálja az analizátor kis sebességét más analizátorokhoz képest (lásd 5. fejezet). Nagyfelbontású készülékek tekintetében a másik általánosan alkalmazott készüléktípus a kvadrupól és repülési idő analizátorral szerelt hibrid készülékek (QTOF). Ezen típus is számos előnyt hordoz magában, úgymint a nagy sebesség (rövid ciklusidők alkalmazhatók növelve az azonosítás hatékonyságát), a számos különböző ionmobilitás-cellával való kapcsolhatóság, valamint az Orbitrapnál jóval alacsonyabb beszerzési és fenntartási költségek. A célzott foszfoproteomikai HPLC-MS vizsgálatokhoz, a peptidekhez hasonlóan, a hármas kvadrupól készülékek hatékonyan alkalmazhatók nagy sebességük és kiemelkedő szelektivitásuk miatt. Ezen vizsgálatoknál igen gyakori a foszforsavak semleges vesztesét célzó foszfopeptid azonosítások. A MALDI ionizációs technika alkalmazása mellett szinte kizárólagosan QTOF készülékek találhatók, a korábban felsoportolt előnyök és a piacon elérhető készülék összeállítások miatt.

### Adatértékelés

A peptidek azonosítása, mennyiségi meghatározása és a foszforilációs helyek lokalizálása a nyers adatokból számos kihívást rejt, és az alkalmazott algoritmusoktól függően akár igen eltérő eredményeket is kaphatunk. Ez növeli a közzétett foszfoproteomikai adatkészletek heterogenitását, ezáltal a különböző publikált eredmények összehasonlíthatósága igen korlátozott. Az adatelemzéshez leggyakrabban a MaxQuant, a Proteome Discoverer, a Byonic és a SkyLine programokat alkalmazzák. A keresőmotorok (pl. Andromeda, Comet, Mascot, SequestHT, X!Tandem) és a foszforilációs hely lokalizációs algoritmusok (pl. D-score, PTM-score, phosphoRS) által alkalmazott találati jóságra vonatkozó pontozási rendszerek alapvetően határozzák meg az elfogadott találatok minőségét. A valós és hamis találatok szűrésére vonatkozó nehézségek hasonlóak a glikomika területén felvázoltakkal (lásd 10-12. fejezet). A kiválasztandó adatelemzési módszer, munkafolyamat elsősorban a megválaszolandó kérdéstől és a minták típusától függ, azonban befolyásolják az alkalmazott készülékek és fragmentációs technikák is.<sup>[20,21]</sup> Mindebből az következik, hogy nem létezik

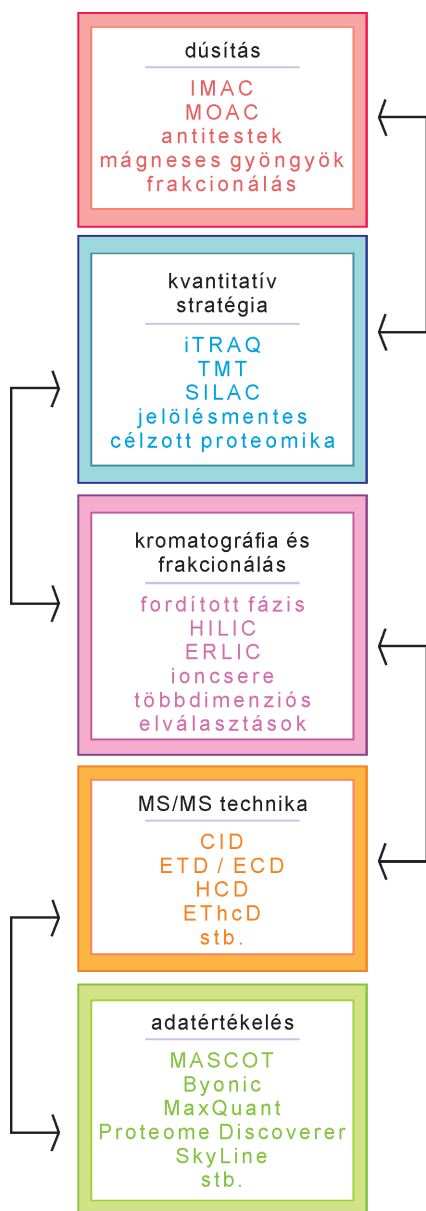
általánosan ajánlott „legjobb” adatelemzési munkafolyamat, azonban az adott projekthez ideális módszerek kiválasztásához ajánljuk az olvasó szíves figyelmébe *Lars Jensen és munkatársai* nemrégiben publikált közleményét, amelyben 22 foszfoproteomikai munkafolyamat hatékonyságát hasonlították össze.<sup>[22]</sup>

### Összefoglaló

A foszforiláció széleskörű biológiai funkciókkal rendelkezik, ezért vizsgálata kiemelt jelentőségű különböző jelátviteli folyamatok feltérképezésére és potenciális terápiás célpontok azonosítására. A tömegspektrometria alapú vizsgálata azonban távolról sem triviális feladat. Számos minta-előkészítési lépés szükséges (pl. frakcionálás, dúsítás, tisztítás) a megfelelő vizsgálhatóság elérése érdekében. Ezen lépésekhez számos lehetőségünk van a laborban rendelkezésre álló technikáktól függően (9.10. ábra).

Tovább nehezíti a feladakört, hogy az optimális körülmények mintatípusonként eltérőek lehetnek, így egy nagyobb sorozat megkezdése előtt mindenképp érdemes optimalizálni a dúsítási és tisztítási munkafolyamatokat.<sup>[23-25]</sup> A módszerfejlesztéshez segítséget nyújthat egy nemrégiben megjelent összefoglaló/oktató jellegű közlemény.<sup>[26]</sup>

A tömegspektrometriás felvételi és adatértékelési módszerek során a minták előkészítéséhez hasonlóan nagy változatosság tapasztalható. Ebben az esetben azonban érdemes figyelmet fordítani ezen két lépés összehangolására, ugyanis a megfelelő kombináció megválasztásával jelentős nyereség érhető el az azonosítás és kvantitatív meghatározás hatékonyságában egyaránt.



9.10. ábra. Általánosan alkalmazható módszerek a foszfoproteomikai munkafolyamat egyes lépéseiben



## Ajánlott irodalom

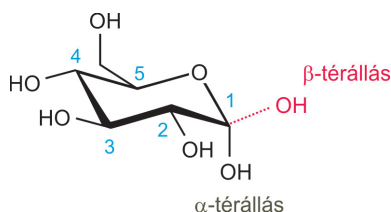
1. Hardman G, Perkins S, Brownridge P, et al. Strong anion exchange-mediated phosphoproteomics reveals extensive human non-canonical phosphorylation. *The EMBO Journal*, 2019; 38:e100847.
2. Nestler E, Greengard P. Protein Phosphorylation is of Fundamental Importance in Biological Regulation. In: Siegel G, Agranoff B, Albers W, et al, eds. *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Lippincott-Raven; 1999:chap 24.
3. Gong CX, Iqbal K. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Curr Med Chem*, 2008; 15:2321-8.
4. Buée L, Bussiére T, Buée-Scherrer V, et al. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*, 2000; 33:95-130.
5. Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow E-M, et al. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 2002; 103:26-35.
6. Tagliabracci VS, Engel JL, Wen J, et al. Secreted Kinase Phosphorylates Extracellular Proteins That Regulate Biomineralization. *Science*, 2012; 336:1150-1153.
7. Leitner A. Enrichment Strategies in Phosphoproteomics. In: von Stechow L, ed. *Phospho-Proteomics: Methods and Protocols*. Springer New York; 2016:105-121.
8. Dunn J, Reid G, Bruening M. Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 2010; 29:29-54.
9. Piovesana S, Capriotti AL, Cavaliere C, et al. Phosphopeptide enrichment: Development of magnetic solid phase extraction method based on polydopamine coating and Ti4+-IMAC. *Anal Chim Acta*, 2016; 909:67-74.
10. Leitner A. Phosphopeptide enrichment using metal oxide affinity chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 2010; 29:177-185.
11. Pocsfalvi G, Cuccurullo M, Schlosser G, et al. Phosphorylation of B14.5a Subunit from Bovine Heart Complex I Identified by Titanium Dioxide Selective Enrichment and Shotgun Proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2007; 6:231-237.
12. Cuccurullo M, Schlosser G, Cacace G, et al. Identification of phosphoproteins and determination of phosphorylation sites by zirconium dioxide enrichment and SELDI-MS/MS. *J Mass Spectrom*, 2007; 42:1069-1078.
13. Li Q-r, Ning Z-b, Tang J-s, et al. Effect of Peptide-to-TiO<sub>2</sub> Beads Ratio on Phosphopeptide Enrichment Selectivity. *Journal of Proteome Research*, 2009; 8:5375-5381.
14. Gilar M, Olivova P, Daly A, et al. Orthogonality of Separation in Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Anal Chem*, 2005; 77:6426-6434.
15. Alpert AJ, Petritis K, Kangas L, et al. Peptide Orientation Affects Selectivity in Ion-Exchange Chromatography. *Anal Chem*, 2010; 82:5253-5259.
16. Alpert AJ. Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography for Isocratic Separation of Charged Solutes and Selective Isolation of Phosphopeptides. *Anal Chem*, 2008; 80:62-76.
17. Melby J, Roberts D, Larson E, et al. Novel Strategies to Address the Challenges in Top-Down Proteomics. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2021; 32:1278-1294.
18. Potel C, Lemeer S, Heck A. Phosphopeptide Fragmentation and Site Localization by Mass Spectrometry: An Update. *Anal Chem*, 2019; 91:126-141.
19. Rožman M. Modelling of the gas-phase phosphate group loss and rearrangement in phosphorylated peptides. *J Mass Spectrom*, 2011; 46:949-955.
20. Zhang Y, Dreyer B, Govorukhina N, et al. Comparative Assessment of Quantification Methods for Tumor Tissue Phosphoproteomics. *Anal Chem*, 2022; 94:10893-10906.
21. Ferries S, Perkins S, Brownridge P, et al. Evaluation of Parameters for Confident Phosphorylation Site Localization Using an Orbitrap Fusion Tribrid Mass Spectrometer. *J Proteome Res*, 2017; 16:3448-3459.
22. Locard-Paulet M, Bouyssie D, Froment C, et al. Comparing 22 Popular Phosphoproteomics Pipelines for Peptide Identification and Site Localization. *J Proteome Res*, 2020; 19:1338-1345.
23. Tóth G, Bugyi F, Sugár S, et al. Selective TiO<sub>2</sub> Phosphopeptide Enrichment of Complex Samples in the Nanogram Range. *Separations*, 2020; 7.
24. Tóth G, Sugár S, Balbisi M, et al. Optimized Sample Preparation and Microscale Separation Methods for High-Sensitivity Analysis of Hydrophilic Peptides. *Molecules*. 2022;27(19). doi:10.3390/molecules27196645
25. Bugyi F, Tóth G, Kovács KB, et al. Comparison of solid-phase extraction methods for efficient purification of phosphopeptides with low sample amounts. *J Chromatogr A*, 2022; 1685:463597.
26. Qiu W, Evans CA, Landels A, et al. Phosphopeptide enrichment for phosphoproteomic analysis - A tutorial and review of novel materials. *Anal Chim Acta*, 2020; 1129:158-180.



## 10. BEVEZETÉS A FEHÉRJEGLIKOZILÁCIÓ SZÖVEVÉNYES VILÁGÁBA

Medzihradsky F. Katalin

A fehérjék talán leggyakoribb poszttranszlációs módosítása (PTM) a glikoziláció. Ennek egyik oka, hogy többféle, különböző módosítást kategorizálunk így, közös vonásuk, hogy egy cukormolekula közvetlenül egy aminosav-oldalláncához kötődik. Ez a direkt kapcsolódás történhet C-, N-, O- vagy S-atomon keresztül, az érintett aminosavak pedig Trp (C-glikoziláció az indolváz C2-n), Asn (N-glikoziláció az amid N-en), Ser, Thr, Tyr, hidroxi-Lys, hidroxi-Pro (glikozidos kötés alifás vagy aromás OH-n) és Cys (glikozidos kötés az -SH csoporton). A fehérjéket dekoráló glikánok változatos nagyságúak és összetételűek, ráadásul egyes cukoregységek lehetnek pl. foszfát-, szulfát- vagy acetilcsoportokkal módosítva. A cukorszerkezetek kialakítására nincs sablonunk, mint pl. a fehérjeszintézisre az mRNS. Leggyakrabban hexózek vagy ezek származékai az építőelemek. Az aldohexózek 4 aszimmetriacentrummal rendelkeznek, azaz 16 különböző izomer tartozik a családba, amelyeket az 5. szénatom relatív konfigurációja alapján minősítünk D vagy L változatnak. A gerincesek



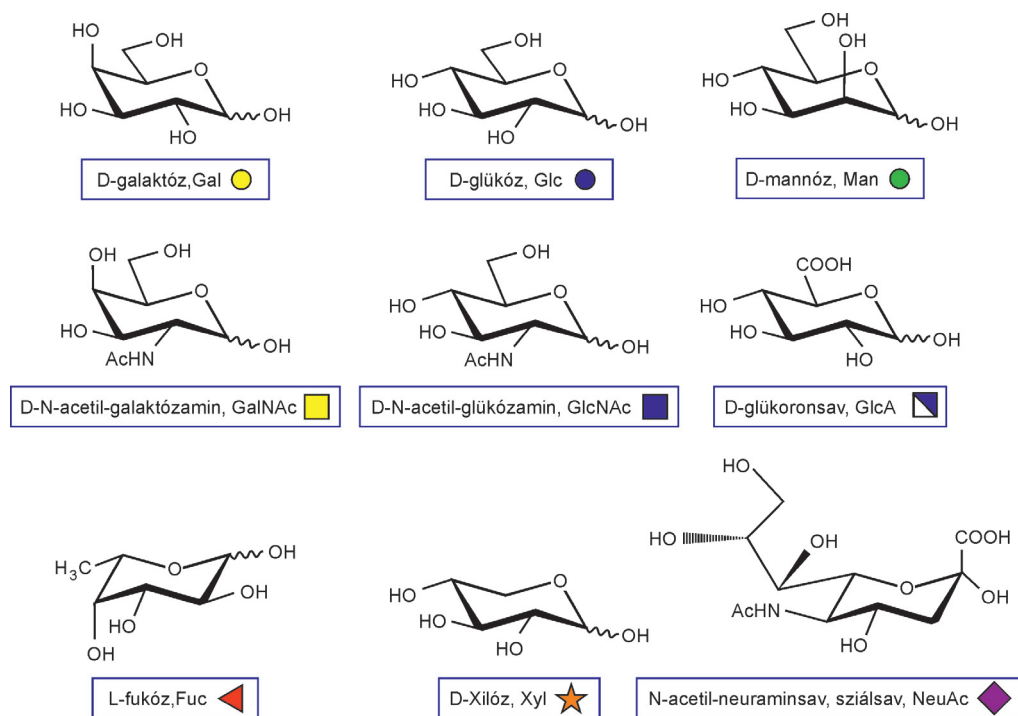
**10.1. ábra.** A hexózek piranózgyűrűjének számozása, és az alfa és béta térállás bemutatása D-glükózon

többnyire a D konfigurációt preferálják. A könyvünkben tárgyalt szénhidrát-szerkezetekben egyedül a fukóz L konfigurációjú. A cukoregységek a glikánokban többnyire gyűrűs formában vannak jelen. A ciklizálás során viszont létrejön egy új kiralitáscentrum, az ún. anomer centrum, amelyben a hidroxilcsoport két különböző térállásban (alfa, béta) lehet jelen

(10.1. ábra). Az alfa/béta jelölés a glikozidos hidroxilcsoportot hordozó szénatom, illetve a cukor nyítláncú formájában ettől legtávolabb eső kiralitás-

centrum szubsztituenseinek egymáshoz viszonyított helyzetére vonatkozik, pl.  $\beta$ -D-glükóz esetén a C1 hidroxilcsoportja és a C5 hidroxi-metil-csoportja cisz,  $\alpha$ -D-glükóz esetén pedig transz helyzetűek. Mindebből következik, hogy már két építőelem is sokféle módon kötődhet egymáshoz a glikozidos kötés gyűrűn belüli pozícióját és térállását illetően, poliszacharidok esetén a lehetséges szénhidrát-szerkezetek száma beláthatatlan. Szerencsére, úgy tűnik, a természet csak véges számú variációt hasznosít. Az emberi szervezet pl. a következő monoszacharidokat használja: D-galaktóz (Gal), D-glükóz (Glc), D-mannóz (Man), D-xilóz (Xyl), L-fukóz (Fuc), N-acetil-D-galaktózamin (GalNAc), N-acetil-D-glükózamin (GlcNAc), D-glükuronsav (GlcA), N-acetil-neuraminsav (sziaolsav, NeuAc) (10.2. ábra).

A szerkezeti variációk további korlátozását/szabályozását a glikoziltranszferázok végzik, amelyeknek specifitása kiterjedhet a módosítható teljes glikánra, vagy csak a terminális pozícióban levő monoszacharidra, a kialakítható kötés pozíciójára és a glikozidos kötés térállására. Hogy milyen szabályok szerint, arról egyelőre kevés tudomásunk van.

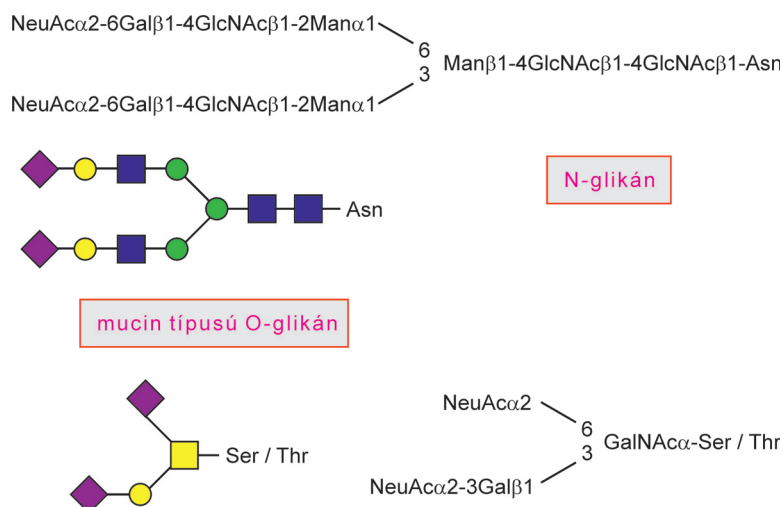


**10.2. ábra.** A gerincesekben általánosan előforduló monoszacharidok szerkezete, neve, elfogadott rövidítése és a Consortium of Functional Glycomics (CFG) által javasolt jele.

(<http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/Nomenclature.shtml>)

Azt viszont tudjuk, hogy a glikoziláció fajspecifikus, fajon belül is más lehet a különböző szervezetekben, szövetekben, sőt sejttípusokban is. A fehérjék glikozilációs mintázata változhat környezeti hatásokra, fiziológiás változásokra, betegségek kialakulása során is. A gerincesek többnyire ugyanazokból a fentebb felsorolt monoszacharidokból építkeznek, glikozilációs folyamataik, alapszerkezeteik hasonlóak. Ugyanakkor az emberre nézve veszélyes, immunogén glikoformákat is termelnek, pl. a szerkezetek lezárására N-glikoil-neuraminsavat (NeuGc) is használnak. A hasonlóságok és különbségek részletesebb tárgyalása túlmutat ezen a fejezeten. Viszont a szénhidrátok izgalmas világát bemutató „*Essentials in glycobiology*” legújabb kiadása minden érdeklődő számára elérhető: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579918/>.

A glikánok pontos szerkezetét a következő szabályok szerint kell bemutatni. Balról, a nemredukáló vég felől kezdjük a láncot, a cukoregységek között feltüntetjük a glikozidos kötés térállását és pozícióját a nemredukáló vég felől kezdve (10.3. ábra). Természetesen az oligoszacharidok szerkezetét megjeleníthetjük az CFG által javasolt szimbólumokkal is (lásd 10.2 ábra), ez a fajta rajzos megjelenítés különösen alkalmas a tömegspektrumok annotálására. Elvileg a szimbólumok közötti kötésekre is beírhatnánk a pozícióra, és térállásra vonatkozó információkat, de tömegspektrometriás adatokból ez többnyire nem áll rendelkezésünkre (lásd alább).

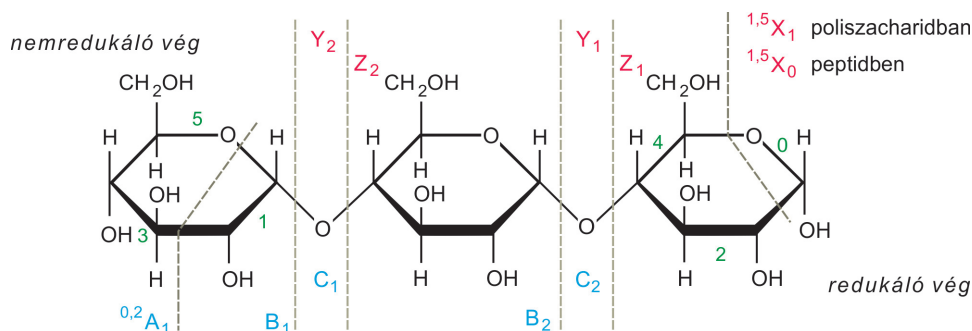


**10.3. ábra.** Oligoszacharidok szerkezetének megjelenítése a glikozidos kötések precíz definiálásával, illetve a CFG szimbólumok segítségével

A glikánszerkezeteket ilyen mélységig többnyire csak úgy lehet kideríteni, hogy az oligoszacharidokat „megszabadítjuk” a fehérjétől, az így kialakult keveréket frakcionáljuk, és az elválasztott komponenseket jellemezzük/azonosítjuk. Ez történhet bonyolult kémiai reakciókkal (a hősi múlt), NMR-rel, megbízható standard vegyületekkel való összehasonlítással. A szénhidrát-analízis külön könyvet érdemel. Itt azt szögeznénk le, hogy bár vannak rá ígéretes kísérletek, pillanatnyilag rutinszerűen nem tudunk ilyen mélységbe hatolni a tömegspektrometria segítségével, különösen akkor nem, ha glikopeptideket vagy pláne glikoproteineket vizsgálunk. Arra van esélyünk, hogy azonosítsuk a módosított peptidet és meghatározzuk a módosító szerkezet monoszacharid-összetételét. A fragmentációból következtethetünk a glikánok szerkezetére is, bizonyos építőegységek egymáshoz viszonyított elhelyezkedésére, összekapcsolódására például. De nem tudjuk azonosítani *per se* melyik hexóz izomerrel van dolgunk, és az milyen konfigurációjú glikozidos kötéssel kapcsolódik a szomszédos monoszacharidhoz. Többnyire az ismert glikánszerkezetekre és bioszintetikus útvonalakra támaszkodva azzal a feltevéssel élünk, hogy egy az összetételnek megfelelő, a fragmentációnak nem ellentmondó ismert oligoszacharidot azonosítottunk egy adott peptiden.

A következő fejezetek témája az N-glikoziláció jellemzése és az O-glikoziláció legelterjedtebb alosztályának, a mucin típusú O-glikozilációnak az analízise lesz. Az analízis során természetesen szükség van MS/MS adatok gyűjtésére. Glikopeptidek elemzésénél lényeges kiemelni, hogy a glikozidos kötés gyengébb, mint a peptidkötés, így az ütközéses aktiválással felvett spektrumokban intenzív glikánfragmensek képződnek, sőt nemritkán ez a fragmentáció válik dominánssá. Tehát célszerű, ha a peptidfragmensek nevezéktana mellé (MS/MS fejezet) megismerjük a szénhidrátok fragmentációjának nomenklaturáját is (10.4. ábra).

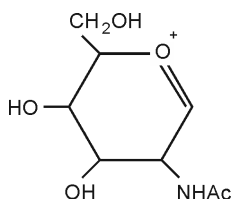
A glikozidos kötés hasadásából származó, a cukor nemredukáló végét tartalmazó ionokat B-, illetve C-ionoknak nevezzük, és a nemredukáló vég felől számozzuk; a redukáló végét tartalmazó fragmenseket Y-, illetve Z-ionokként kategorizáljuk, ezeket is a megfelelő terminus felől számozzuk. A gyűrűhasadással képződő fragmensek (A- és X-ionok) két azonosí-



**10.4. ábra.** Szénhidrátláncok MS/MS fragmentációjának nevezéktana [Domon&Costello Glycoconjugate journal 1988, 5, 397]. Azokat a fragmenseket, amelyek a redukáló véget tartalmazzák, piros színnel jelöltük, a nemredukáló vég fragmenseit pedig késsel. A kötések számozását – zöld színnel – a két szélső gyűrűn mutatjuk be.

tót is kapnak: jobb alsó indexben azt jelezzük, hogy a megfelelő végtől számítva hányadik gyűrű érintett (A fragmens), ám az X-ionoknál a második gyűrű kapja az egyes számot, míg bal felső indexben feltüntetjük, hogy a gyűrűn belül mely kötések hasadtak. Amennyiben elágazó szerkezettel van dolgunk, a görög abc betűit alkalmazzuk a láncokra, a leghosszabbal kezdve. A glikopeptidek CID/HCD spektrumában leggyakrabban megjelenő fragmensek a glikozidos kötés hasadásával képződő B oxóniumionok és a megfelelő Y fragmensek. Az utóbbiak gyakran intenzívebbek, hisz a glikán redukáló vége a jobban protonálódó peptidhez kapcsolódik. Itt emelném ki azt is, hogy

amennyiben kettős kötéshasadások lehetségesek (HCD/CID ütközési cellában), a cukrokból is képződhetnek belső fragmensek, azaz néhány monoszacharid egységből álló, a szerkezet belsejéből kiszakadó darabok detektálhatók B-típusú, azaz oxóniumion formájában. Bemutatom a HexNAc oxónium szerkezetét ( $m/z$  204.087), amely N- és mucin típusú O-glikánokból egyaránt képződik, peptidionokkal össze nem keverhető, így detektálása egyértelműen GlcNAc vagy/és GalNAc jelenlétére utal (10.5. ábra).



**10.5. ábra.** HexNAc oxóniumion

Amennyiben az MS/MS fragmentáció elektronbefogás vagy -transzfer eredményeként egy gyökionban megy végbe, az ütközéses aktiválásban törekény glikán többnyire épen marad.

Az N- és O-glikozilációról szóló fejezetekben részletesen kifejtünk több pontot, amit csupán érintőlegesen említettünk itt, mert a módszereket a vizsgált mintákhoz kell szabni, és a titok a részletekben rejlik.

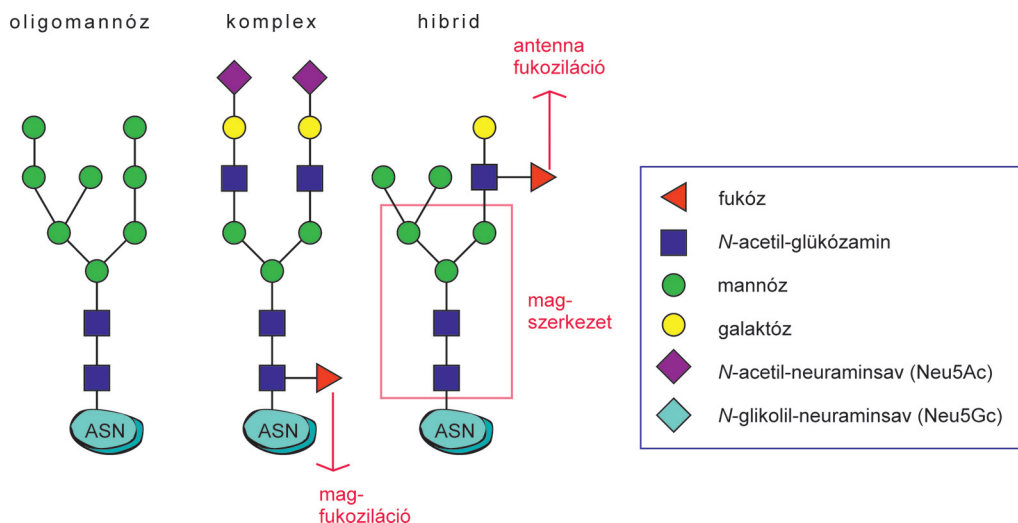
# 11. FEHÉRJE N-GLIKOZILÁCIÓ

Turiák Lilla,  
Révész Ágnes,  
Tóth Gábor,  
Drahos László

## Szerkezet, osztályozás

Az emlősökben az *N*-glikán láncokat leggyakrabban az alábbi monoszacharid-egységek építik fel: Man, Gal, GlcNAc, Fuc, NeuAc és NeuGc (lásd 10. fejezet). Az *N*-glikoziláció olyan aszparagin (Asn) oldalláncon következhet be, ahol az Asn-t követő második aminosav szerin vagy treonin (Asn-X-Ser/Thr, X = bármilyen aminosav, kivéve prolin), ez az úgynevezett *konszenzus szekvencia*.<sup>[1]</sup> Nem minden konszenzus szekvenciában található Asn amid csoportjához kapcsolódnak azonban *N*-glikán-láncok, ezt befolyásolja a konszenzus szekvencia meglétéén túl többek között a C-terminustól való távolsága és a konszenzus szekvenciát megelőző aminosav típusa is.<sup>[2]</sup> Az *N*-glikán bioszintézis a citoszolban egy foszfolipid prekuzormolekulán, a dolikol-foszfáton kezdődik, melynek oldallánca 2 GlcNAc-ot, 9 Man-t és 3 glükózt tartalmaz. Az endoplazmatikus retikulum membránjában a lipid dolikol-foszfát-molekula oldalláncáról kerül át a 14 monoszacharidból álló oligoszacharid-egység a meghatározott konszenzus szekvenciában található Asn oldalláncán levő amid nitrogénre.<sup>[1]</sup> Ezt követően glikozidáz enzimek bontják és glikoziltranszferáz enzimek módosítják az oligoszacharid lánc szerkezetét az endoplazmás retikulum lumenében és a Golgi-apparátusban. A szintézis utolsó lépéseiben Fuc és szíalsav (NeuAc vagy NeuGc) kerülhet a lánc meghatározott részeire. A glikánlánc végső szerkezetét az adott sejt fiziológiás állapota határozza meg.<sup>[1]</sup>

Az eukariótákban az *N*-glikánoknak három osztályát különböztetjük meg, melyek mindegyikében megtalálható egy közös, pentaszacharidból álló *magszerkezet* (11.1. áb-



11.1. ábra. Az *N*-glikánok három fő osztálya és a leggyakoribb monoszacharidok szimbolikus jelölése

ra).<sup>[11]</sup> A magszerkezet felépítésében 2 db GlcNAc és 3 db Man vesz részt. A magszerkezeten kívül csak Man-t tartalmazó *N*-glikánokat *oligomannóz* típusnak nevezzük. Amennyiben a magszerkezetben levő Man-okhoz „antenna” kapcsolódik, *komplex N*-glikánokról beszélünk. Az *N*-glikánok harmadik osztályát a *hibrid* típus alkotja, melyben az egyik Man-hoz antenna, a másik Man-hoz pedig további Man cukrok kapcsolódnak. Az oligoszacharidláncokhoz Fuc is kapcsolódhat, a magon található legbelső GlcNAc-hoz (mag-fukoziláció) vagy az antennában található GlcNAc-hoz (antenna-fukoziláció). Az oligoszacharidláncot a terminális Gal-hoz csatlakozó szialsav (NeuAc vagy NeuGc) zárja le. Fontos megemlíteni, hogy a komplex és hibrid glikánok szerkezete variábilis, az „antennák” sok esetben csak részben épülnek fel, illetve tartalmazhatnak egy ún. *bisecting* GlcNAc egységet is, mely a magon található középső Man-hoz csatlakozik. Ez a variabilitás irányítja a biológiai funkciókban bekövetkező változásokat.

### Biológiai funkciók

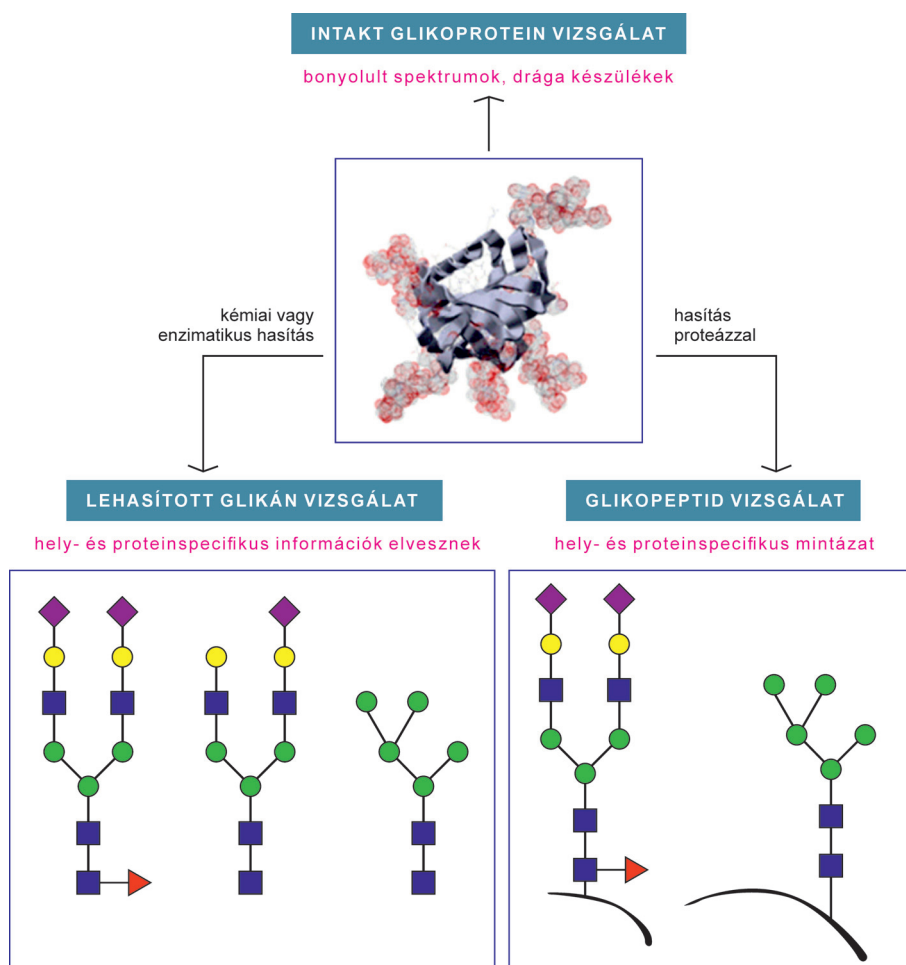
Az *N*-glikoziláció biológiai szerepe rendkívül fontos és változatos, a bioszintézis során bekövetkező zavarok súlyos betegségekhez vezethetnek.<sup>[3]</sup> Az *N*-glikozilált fehérjék legfontosabb szerepe a sejtek közötti kommunikációban van. A sejtfelszíni glikánok szerkezete befolyásolja többek között a sejtek közötti jelátvitelt, molekuláris felismerést, pl. az antigénprezentáló fehérjék is glikoziláltak. Vírusok sejtekbe történő bejutása is a sejtfelszíni glikozilációtól függ.<sup>[4]</sup> Különböző immunológiai eredetű és daganatos betegségekben írták le bizonyos glikoproteinek *N*-glikozilációs mintázatának megváltozását, melyek diagnosztikus jelentőséggel is bírnak.<sup>[5]</sup> A daganatos és gyulladásos kórképek kezelésére alkalmazott monoklonális antitestek is glikozikáltak. Példaképp érdemes megemlíteni, hogy amennyiben a monoklonális antitestben található glikán fukozilált, az jelentősen megváltoztatja a molekula tulajdonságait, csökkentve terápiás hatékonyságát.<sup>[6]</sup> A glikoziláció biológiai és klinikai fontosságának megértésére célzott, nagy áteresztőképességű vizsgálatokat végeznek, melyekhez nélkülözhetetlen a vizsgálati módszerek validálása és standardizálása. Ezen vizsgálatok középpontjában általában egyedi glikoproteinek állnak, melyek megváltozott glikozilációs mintázatát detektálják betegségekben vagy akár az életkor előrehaladásával.

### Tömegspektrometriás vizsgálati megközelítések

Az *N*-glikozilált fehérjék szerkezetének jellemzése három megközelítéssel lehetséges: i) intakt glikoproteinek vizsgálata, ii) lehasított glikánok vizsgálata, iii) proteolitikus emésztés során keletkező glikopeptidek vizsgálata (**11.2. ábra**). Az utóbbi két technika esetén minden esetben szükséges hasítás (emésztés) a vizsgálandó molekulák méretének csökkentéséhez. Glikopeptidek vizsgálatánál a proteolitikus emésztést követően keletkező glikopeptideket elemezzük. Az oligoszacharidok független tanulmányozásához kémiai reakcióval vagy enzimatikusan lehasítjuk az *N*-glikánokat a fehérjékről, így azok különállóan vizsgálhatóvá válnak.

#### ■ Lehasított glikánok vizsgálata

A legrégebbi megközelítés az oligoszacharidlánc peptidvázról történő kémiai vagy enzimatis hasítása.<sup>[7]</sup> Ez a legegyszerűbb és gyakran alkalmazott módja az *N*-glikánok vizsgálatának. A kémiai hasítás hidrazinolízis segítségével végezhető, amely során a hőmérséklet változtatásával szelektíven hasíthatóak az *O*-, illetve *N*-glikánok. Előbbiek 60 °C körül, míg utóbbiak 95 °C-on hasadnak. A reakció során alkalmazott magas hőmérséklet és



11.2. ábra. Glikoproteinek vizsgálati lehetőségei

erős bázis azonban hátrányos, hiszen roncsolhatja a peptidok közötti kötések, illetve a glikánstruktúrákat is (monoszacharid-vesztések).

Kíméletesebb és elterjedtebb az enzimatiskus hasítás peptid *N*-glikozidáz-F (PNGáz-F) enzim használatával. A PNGáz-F az Asn és a hozzá közvetlenül kapcsolódó legbelső GlcNAc között hasít, kivéve, ha a mag szerkezetén  $\alpha$ 1–3 típusú kötésben Fuc található vagy ha egyetlen GlcNAc kapcsolódik az Asn-hoz. Az enzim legalább három aminosav hosszúságú glikopeptidek és glikoproteinek esetén is hatékonyan alkalmazható. Az enzimatiskus hasítást 37 °C-on végzik, általában egy éjszakán át tartó inkubálással. A reakció eredményeként, a glikánlánc hasítását követően a peptidszekvenciában található Asn aszparaginsavvá (Asp) alakul, így egy proteomikai mérés során a tömegeltolódásból következtetni lehet, hogy egy adott peptid glikozilált volt-e. Rendelkezésre állnak további enzimek is, például a peptid *N*-glikozidáz A enzim, mely mag-fukozilált glikopeptidek esetén hatékonyabb, illetve az alacsony pH-optimummal rendelkező peptid *N*-glikozidáz H enzim, mely az esetleges szílsav-vesztések miatt nem kedvező.



A lehasított oligoszacharidokat általában származékképzést követően vizsgálják.<sup>[7]</sup> A származékképzés egyik célja a glikánok hidrofobicitásának és a detektálás érzékenységeinek (fluorofór vagy kromofór csoport) növelése, mely lehetővé teszi fordított fázisú kromatográfiás oszlopon történő elválasztásukat. A kromofór csoport továbbá lehetővé teheti fluoreszcens detektálásukat is. Származékképzés során a glikánokat permetilálják, vagy redukatív aminálási reakcióban fluorocsoportokat építenek a glikánláncba, javítva ionizációs hatékonyságukat.<sup>[7]</sup> A permetilálással egy további cél a láncban elhelyezkedő labilis monoszacharidok, mint a szialsav és Fuc stabilitásának biztosítása, hogy az ionforrásban ne következzen be nemkívánatos fragmentáció és átrendeződés, amely a szerkezetmeghatározást hátráltatja.

Natív és jelölt oligoszacharidok elválasztása folyadékkromatográfia vagy kapilláris elektroforézis segítségével történhet, utóbbi esetben ritkább az on-line tömegspektrométeres detektálás. Fordított fázisú folyadékkromatográfiát jelölt oligoszacharidok esetén alkalmaznak, míg porózus grafit oszlop és hidofil interakciós kromatográfia natív és jelölt glikánok esetén is használható. Porózus grafit oszlopok esetén a retenciós idő növekszik a glikán méretével és a savas csoportok számának növekedésével. Rendkívül hatékony technika izomer szerkezetek elválasztására. A módszer hátránya, hogy a sok szialsavat tartalmazó szerkezetek nehezen eluálthatók, így visszanyerési problémák adódhatnak. Hidofil interakciós kromatográfiában változatos állófázisok (pl. amin, amid, ikerionos) állnak rendelkezésre, amelyek a glikánok összes osztályára jól működnek.

A lehasított glikánok elválasztás nélkül, közvetlenül is vizsgálhatóak tömegspektrometriával. Az ionmobilitás-tömegspektrometria hatékonyan alkalmazható a különböző izomer szerkezetek elválasztására (lásd 15. fejezet). MALDI ionizációt is sok esetben alkalmaznak jelöletlen és jelölt oligoszacharidok vizsgálatára. A MALDI képképzés különböző glikán szerkezetek szöveten belüli elhelyezkedéséről nyújthat információt (lásd 13. fejezet).

## ■ Glikopeptidek vizsgálata

A glikoproteint vagy glikoproteineket is tartalmazó keveréket hasíthatjuk proteáz enzimmel, mely egy peptideket és glikopeptideket tartalmazó keveréket eredményez. Ebben az esetben a vizsgálat hatékonyságát nagymértékben növeli, ha a mintában a glikopeptideket dúsítjuk. Dúsításra több módszer áll rendelkezésre,<sup>[8]</sup> azonban általánosan elmondható, hogy mindegyik torzítja bizonyos mértékben a glikozilációs mintázatot, hiszen az egyes módszerek a különböző oligoszacharid-szerkezetekre eltérő szelektivitást mutatnak.

A glikopeptidek vizsgálatának *bonyolultsága* a kiindulási mintától is nagymértékben függ. *Izolált glikoproteinek esetén* (pl. monoklonális antitest) a minta-előkészítés és az értékelés is egyszerűbb. *Bonyolultabb keverékek esetén* (pl. vér, szövetminta) a glikopeptidek vizsgálata nagyobb kihívást jelentő feladat, a lehasított glikánoknál az izolált glikoproteinek vizsgálatával ellentétben, szinte elengedhetetlen egy glikoproteinek/glikopeptidek részarányát növelő dúsítási lépés beiktatása a munkafolyamatba. Dúsítás alkalmazható az enzimatis hasítást megelőzően glikoprotein szinten, vagy azt követően glikopeptidszinten is. A dúsítás célja az ionsuppresszió mértékének csökkentése, és az érzékenység növelése. A különböző módszereket sokszor kombinálják. *Dúsításra alkalmazható módszerek* közé sorolható az affinitáskromatográfia, a kovalens interakción alapuló kölcsönhatások és kromatográfián, valamint szilárdfázisú extrakción alapuló módszerek.

*Affinitáskromatográfián* belül az immunaffinitás és lektinaffinitás kromatográfia alkalmazása terjedt el a glikoproteomikában. *Immunaffinitás kromatográfiát* célzott glikoproteinek vizsgálata esetén használnak és jelentős érzékenység növekedés érhető el a módszer-

rel, pl. protein-G alkalmazása immunoglobulinok dúsítására. A természetben előforduló növényi lektinek nagy affinitással képesek bizonyos glikánstruktúrák megkötésére. *Lektin-affinitás kromatográfia* során nem ritka több növényi lektin együttes alkalmazása az eltérő glikánszerkezetek egyidejű dúsítására. A lektineket általában különböző gyantákhoz vagy HPLC kompatibilis mátrixokhoz kötik, és centrifuga vagy kromatográfiás oszlopokba töltik. A lektinek iránt affinitást mutató glikánszerkezeteket tartalmazó glikopeptidek megkötődnek az oszlopon, míg a nem glikozilált peptidek és a lektin iránt affinitást nem mutató glikopeptidek átesnek az oszlopon. Ezt követő lépésben a megkötődött glikopeptidek eluálhatók.

*Kovalens interakción alapuló dúsítás* során kovalens kötés alakul ki a funkcionális fázis és a glikoprotein között. A módszernek két típusa létezik: a hidrazid kémián és a bórsav kölcsönhatáson alapuló. A *hidrazid kémián alapuló dúsítás* fő lépései az alábbiak: 1. szénhidrátok cisz-diol csoportjainak aldehiddé történő oxidációja perjodáttal, majd 2. az aldehidcsoportok és a szilárd fázis immobilizált hidrazidcsoportjai közötti hidrazonképzés, mely lépés során kovalensen kötődnek a glikoproteinek, míg a nem glikozilált fehérjék lemoshatók. Következő lépésben az immobilizált glikoproteinek tripszines hasítása során a nem glikozilált peptidek eltávolíthatók, míg a glikopeptidek továbbra is a szilárd fázison maradnak. A glikopeptidek PNGáz-F enzim segítségével hasíthatók le. A bórsav a cisz-diol csoportokat tartalmazó glikánokkal képez kovalens kötéssel ciklikus észtereket, melyek magas pH-n képződnek szelektíven és a reakció savas körülmények között reverzibilis. A lektinnekkel ellentétben, a szacharidok szélesebb tartománya dúsítható, hiszen nemcsak specifikus glikánokat köt a bórsav.

*Kromatográfián és szilárdfázisú extrakción alapuló módszerek* közül glikopeptidek dúsítására gyakran alkalmazzák a poláris vegyületek esetén hatékony hidrofil interakciós kromatográfiát (lásd 4. fejezet) és az elektrosztatikus taszításon alapuló hidrofil interakciós kromatográfiát (ERIC). Ez utóbbi a hidrofil és elektrosztatikus kölcsönhatások segítségével semleges és NeuAc-tartalmú glikopeptidek egyidejű dúsítását teszi lehetővé. Egyéb módszerek közül az erős kationcsere során a terminális szíalsavval rendelkező glikopeptidek dúsíthatók, míg titán-dioxid állófázis a magas szíalsavtartalmú glikánok szelektív vizsgálatára használatos.

### ■ Oldószeres kicsapás

A hidrofil glikopeptidek és a nem glikozilált peptidek eltérő oldékonysággal rendelkeznek acetóban, így a glikopeptidek a megfelelő kísérleti paraméterek beállításával szelektíven dúsíthatók.<sup>[9]</sup> A glikopeptidek többsége a csapadékban dúsul, míg a nem glikozilált peptidek a felülúszóba kerülnek. A két frakciót külön vizsgálva információt nyerhetünk a mintánkban található glikopeptidekről és peptidekről egyaránt.

### ■ Glikopeptidek tömegspektrometriás mérése

A dúsítási lépést követően a glikopeptid-keverék tömegspektrometriás mérése MALDI és ESI ionizációval is lehetséges. Bonyolultabb keverékek vizsgálata során előnyös egy elválasztástechnikai lépés alkalmazása. Folyadékkromatográfia esetén a fordított fázis a leggyakoribb, mely során a retenciót elsősorban a peptidszekvencia befolyásolja, az oligoszacharid-lánc hatása kisebb. Glikopeptidek elválasztása grafit és HILIC állófázison is lehetséges. Kapilláris-elektroforézis használata ritkább, de felfutóban lévő technika. Egy új, felfutó kutatási irány a glikopeptidek ionmobilitás-tömegspektrometriával történő analízise (lásd 15. fejezet).

## ■ Lehasított glikánok és glikopeptidek vizsgálatának összehasonlítása

A lehasított glikánok vizsgálatával foglalkozó glikomika és glikopeptidek esetén alkalmazott glikoproteomikai módszerek összehasonlítása a **11.1. táblázatban** található mintaelőkészítés, ionizáció, elválasztástechnika és tandem tömegspektrometrián alapuló szerkezetmeghatározás szempontjából. A glikomika ugyan egyszerűbb technika, de fő hátránya, hogy csak egy összesített (átlag) glikozilációs profilt kapunk, azaz i) elvész az információ, hogy egy adott oligoszacharid-struktúra, melyik fehérje melyik Asn-hoz kapcsolódott, valamint ii) az egyedi változások beleolvadhatnak az átlagba. A helyspecifikus glikoziláció ismerete viszont fontos lehet többek között különböző betegségek vizsgálata esetén, és szükségessé teszi a nehezebben megvalósítható glikopeptid-analízist. Lehasított glikánok vizsgálata esetén további problémát jelenthet, hogy a különböző fajokból és fehérjékből származó oligoszacharidok nem elkülöníthetők, pl. ha sejtvonalból izolált glikoproteineket vizsgálunk, a tápoldatból származó marhaszérum glikoproteinek glikánjai is jelen lesznek az összesített glikozilációs profilban.

**11.1. táblázat.** Lehasított glikánok és glikopeptidek vizsgálatának összehasonlítása

	Glikomika	Glikoproteomika
<b>Vizsgált minta</b>	Lehasított glikánok	Glikopeptidek
<b>Mintaelőkészítés</b>	Derivatizálás fontos az érzékenység növeléséhez	Glikopeptidek dúsítása általában szükséges
<b>Elválasztástechnika, ionizáció</b>	Izomerszerkezetek meghatározása esetén fontos, MALDI és ESI ionizáció	Fontos, főként ESI ionizáció
<b>Szerkezet meghatározás</b>	Főleg ioncsapda CID	CID, HCD, elektronbefogásos technikák és ezek kombinációja
<b>Információ</b>	Mintára jellemző átlagolt mintázat	Részletes, fehérjére jellemző helyspecifikus glikozilációs mintázat
<b>Adatértékelés</b>	Egyszerűbb, amennyiben csak az összetétel a fontos	Bonyolultabb, szoftveres támogatás elengedhetetlen

## ■ Intakt glikoproteinek vizsgálata

Vizsgálhatjuk tömegspektrometria segítségével magát az intakt glikoproteint, de keverékek esetén ez jóval bonyolultabb feladat. A minta-előkészítés viszonylag egyszerű, gyakran alkalmaznak oldószercserét vagy affinitáson alapuló dúsítást a mérések elvégzése előtt. MALDI ionizáció, direkt infúzió vagy elválasztástechnikai kapcsolás is megvalósítható ESI-vel. Vizsgálatukhoz elengedhetetlenek a nagyfelbontású tömegspektrométerek (TOF, Q-TOF, Orbitrap, FT-ICR), melyekkel meghatározható a glikoprotein fehérjeszekvenciája és összes glikozilációs helye. Nagy méretüknek köszönhetően a glikoproteinek kisebb érzékenységgel vizsgálhatók és a spektrumok értelmezését nehezítik a bonyolult, sok esetben átlapoló spektrumok. Fragmentációjukhoz elektronbefogáson alapuló technikák használatosak (lásd 7. fejezet). Több intakt glikoproteint tartalmazó keverékek csak elválasztást követően vizsgálhatóak, a kis mennyiségben jelen levő glikoformák megbízható azonosítása miatt.<sup>[10]</sup> Intakt glikoproteinek kromatográfiás elválasztása nem triviális, a módszerek nagy része (pl. ioncserés és hidrofób interakciós kromatográfia) nem kompatibilis tömegspektro-

metriás detektálással, vagy nem rendelkezik kellő szelektivitással (pl. fordított fázis) a glikoformák elválasztásához. Glikoproteinek elválasztására is alkalmazható a poláris vegyületek esetén gyakran alkalmazott hidrofíli interakciós kromatográfia.<sup>[10]</sup> Szükséges a mobilfázisban ionpárhépző alkalmazása, így a retenciót a szénhidrát-rész befolyásolja. Bonyolultságának köszönhetően az intakt glikoproteinek vizsgálata terjedt el legkevésbé, és elsősorban monoklonális antitestek szerkezetének jellemzésére használják.

### ■ Tandem tömegspektrometriás technikák a glikomikában, glikoproteomikában

Az N-glikánok tömegspektrometrián alapuló vizsgálata során számos nehézséggel kell megbirkózni.<sup>[11]</sup> A fehérje és oligoszacharid-lánc szerkezetének egyidejű meghatározása bonyolult feladat, általában külön lépésben történik. A glikánok a peptideknél könnyebben hasadnak, vizsgálatukra lágy ionizációs technikák, leggyakrabban ESI és MALDI használhatók. Natív oligoszacharidok vizsgálatakor pozitív ionizáció esetén a láncvégi szílsav könnyen lehasad, így célszerű a negatív ionizáció alkalmazása.

### ■ Oligoszacharidok szerkezetének meghatározására használt tandem tömegspektrometriás technikák

Hasított oligoszacharidok részletes szerkezetéről tandem tömegspektrometriás mérések és exoglikozidáz enzimek alkalmazásával tájékozódhatunk.<sup>[7]</sup> A glikánlánc monoszacharid összetételére a molekulaion pontos tömegéből következtethetünk. Ioncsapda, illetve kis energiájú beam-type CID esetén a glikozidos kötések hasadásából a láncelágazásról kaphatunk információt. Nagyobb energiájú beam-type CID esetén a gyűrűk fragmentációjából a glikozidos kötés típusáról kapunk felvilágosítást. Míg a protonált oligoszacharidok esetén főként a glikozidos kötések hasadnak, addig fém adduktok esetén kisebb energiájú CID során a gyűrű fragmentációk is bekövetkeznek, mivel a gyűrű oxigénjéhez kapcsolódó fémion lokalizálja az elektronokat és gátolja a glikozidos kötések hasadását.<sup>[17]</sup>

Az újabb, elektronbefogáson alapuló tandem tömegspektrometriás technikák lehetővé teszik az oligoszacharidok még részletesebb szerkezetmeghatározását, azonban a tömegspektrometriai adatok értékelése meglehetősen bonyolult és nagymértékben támaszkodik adatbázisok és keresőmotorok használatára.<sup>[7]</sup> Egy széles körben alkalmazott szoftver a Glycomod,<sup>[12]</sup> amely natív és derivatizált glikánok összes lehetséges szerkezeti összetételét jósolja a kísérletileg meghatározott tömeg alapján. Léteznek glikomikai adatbázisok, mint például az UniCarbKB,<sup>[13]</sup> melyben az egyes szerkezetekhez biológiai eredet, lehetséges funkció és kísérleti adatok vannak hozzárendelve.

Az oligoszacharid-lánc teljes szerkezete visszakövetkeztethető sorozatos exoglikozidáz emésztéssel, amikor is a lánc nem redukáló végéről távolítjuk el egyenként vagy kis csoportokban a szacharidegységeket.<sup>[7]</sup> Az exoglikozidáz enzimek változatos specifitással rendelkeznek, vannak széles specifitású (pl. összes terminális galaktózra) és szűk specifitású (pl. meghatározott kötéstípussal kapcsolódó monoszacharidra) enzimek is. Az enzimatis hasítást követően a képződő glikánok UV, fluoreszcens vagy tömegspektrometriás detektálással azonosíthatók.

### ■ Glikopeptidok szerkezetének meghatározására használt tandem tömegspektrometriás technikák

Az N-glikopeptidok tömegspektrometriás karakterizálása és azonosítása leggyakrabban fordított fázisú kromatográfiás elválasztást követően történik. Kvalitatív analízisük magában

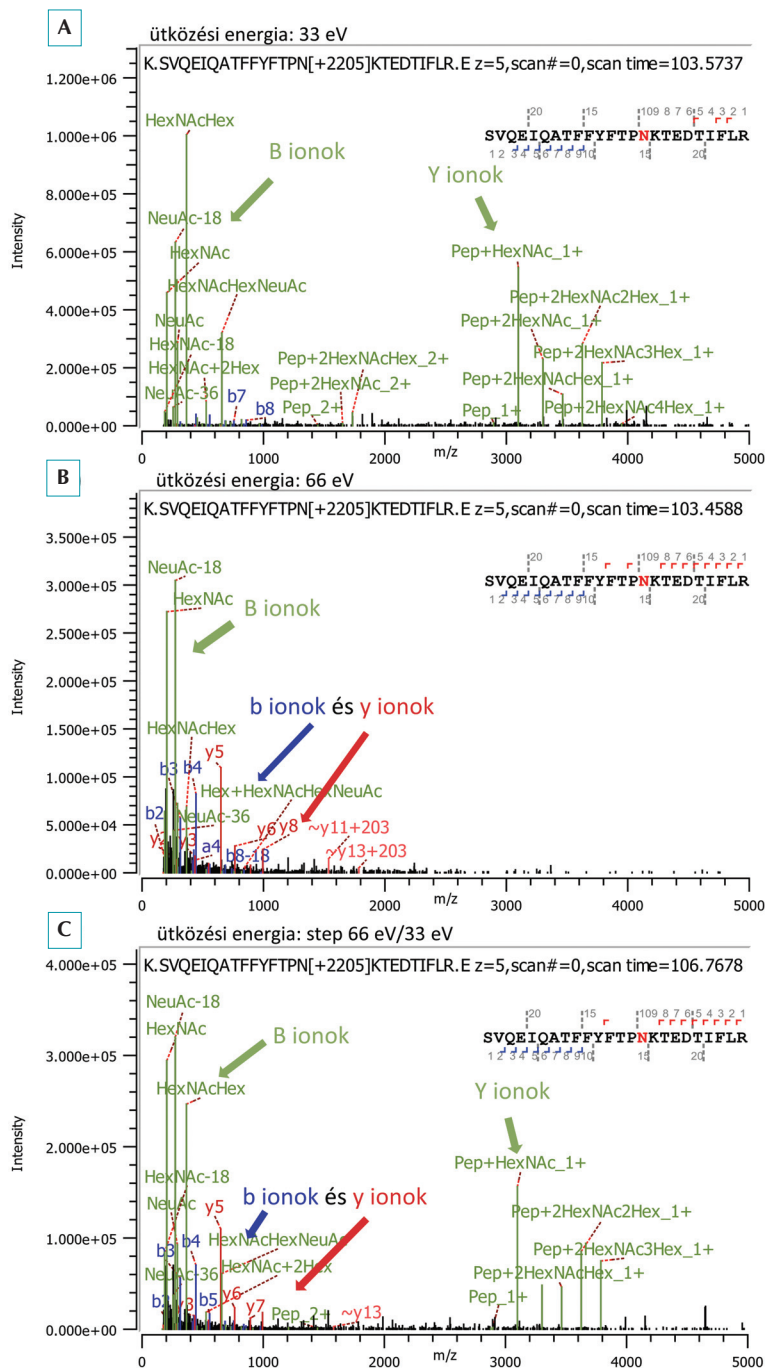
foglalja a peptidszekvencia, a hozzá kapcsolódó glikánszerkezet és a kapcsolódási hely meghatározását. Ezeket a szerkezeti információkat az *N*-glikopeptidek fragmentációs spektrumából nyerhetjük, amelyet általában adatfüggő adatgyűjtési módban (lásd 6. fejezet) veszünk fel. A már említett nehézségek mellett további kihívást jelent, hogy az oligoszacharid-láncok glikozidos kötése jóval gyengébbek, mint az aminosavlánc peptidkötései. Ennek következtében vizsgálatukhoz gyakran egymást kiegészítő fragmentációs technikák együttes alkalmazása vagy adott módszer esetén többféle kísérleti paraméter kombinálása szükséges.<sup>[14]</sup>

Az azonosítást követően végezhetjük el a kvantitatív vizsgálatot, azaz a glikozilációs mintázat meghatározását. A kvantitatív analízis fontosságát többek között az adja, hogy a mintázat változásai, pl. az elágazási fok megnövekedése, az oligomannóz-szerkezetek megjelenése vagy a terminális szialsavak számának változása, számos betegséggel összefüggésbe hozható, így diagnosztikus szereppel bír. A mennyiségi meghatározás általában MS1 felvétel alapján történik, ahol az *N*-glikopeptid relatív mennyiségét a molekulára jellemző *m/z* értéknél mért intenzitás időbeli változásának, azaz ionkromatogramjának (extracted ion chromatogram, XIC) csúcs alatti területe adja.

Tandem tömegspektrometriában számos fragmentációs technika áll rendelkezésre, melyek eltérő, részben komplementer szerkezeti információt szolgáltatnak az *N*-glikopeptidekről.<sup>[15]</sup> Az ionsapda típusú CID során a gerjesztést sok, kisenergiájú ütközéssel érjük el, és szelektíven a prekursor gerjesztődik (rezonanciaaktiválás), a fragmensek nem hasadnak tovább. Ennek következtében a legkisebb disszociációs energiájú kötések hasadnak fel, vagyis *N*-glikopeptidek esetén főként az oligoszacharid-lánc glikozidos kötése bomlanak. A spektrumban a Domon–Costello-nevezékten szerinti B és Y fragmensek (lásd 10. fejezet) dominálnak, így elsősorban a glikánstruktúra szerkezetéről kaphatunk információt. A peptidszekvencia meghatározásához egyéb technikákat is be kell vetni, például ETD (elektrontranszfer disszociáció, electron-transfer dissociation), ECD (elektronbefogásos disszociáció, electron-capture dissociation) vagy QToF/CID/HCD fragmentáció.

A proteomikában jóval gyakrabban alkalmazzuk az ún. beam-type CID fragmentációs módszert. Ilyen típusú fragmentáció játszódik le QToF (kvadrupól-repülési idő, quadrupole time-of-flight) és QQQ (hármass kvadrupól, triple quadrupole, QQQ) készülékek ütközési cellájában, valamint Orbitrap készülékekben HCD (higher-energy collisional dissociation, HCD) fragmentációs módban. A fő különbségek az előző módszerhez képest, hogy a fragmens ionok is gerjesztődnek, valamint kevesebb, de nagyobb energiájú ütközés történik. Így az erősebb kötések is bomlanak, és egymást követő, többszörös kötéshasadást kiváltó (konszekutív) fragmentációs folyamatok is lejátszódhatnak.

Ezen technika esetén az MS/MS spektrumot nagymértékben befolyásolja az alkalmazott ütközési energia nagysága, amely egy viszonylag tág tartományban változtatható. Kisebbségi ütközési energia esetén az *N*-glikopeptid glikán része hasad, B- és Y-ionok keletkeznek, és a peptidlánchoz kapcsolódó oligoszacharid szerkezetét határozhatjuk meg (11.3. ábra, A). Tipikusan a fukóz- és a szialsavegységek szakadnak le legkönnyebben, annyira, hogy a fukóz helyzetének (mag vagy antenna) és a glikánban található szialsavak számának meghatározása még minimális ütközési energiával is kihívás lehet. Nagyobb ütközési energiával felvett MS/MS spektrumban megjelennek a gyűrűhasadással járó folyamatok fragmens ionjai. Az ütközési energia további növelésével az amidkötések bomlanak b- és y-típusú fragmenseket eredményezve (lásd 7. fejezet), amelyek lehetővé teszik az aminosav-szekvencia azonosítását (11.3. ábra, B).



**11.3. ábra.** Az SVQEIQATFFYFTPNKTEDTIFLR-HexNAC(4)Hex(5)NeuAc(2)<sup>5+</sup> N-glikopeptid CID MS/MS spektruma különböző ütközési energia beállítások mellett: A) 33 eV, B) 66 eV és C) kétfélcpsős módszer 33 eV és 66 eV kombinálásával. A spektrumokat Bruker Maxis II ETD QToF készülékkel vettük fel.



A fentiekből következően, beam-type CID fragmentációs technikával úgy kaphatunk az N-glikopeptidek glikán és peptid részéről is információt, ha az MS/MS spektrum felvételekor több, különböző ütközési energiát használunk, így ún. *kevert energiás spektrumot* veszünk fel (11.3. ábra, C). Az így kapott spektrumban egyszerre lesznek jelen az oligoszacharid szerkezetre jellemző B- és Y-ionok, valamint a peptidszekvencia meghatározásához szükséges b- és y-fragmensek. Ez megvalósítható néhány (tipikusan 2 vagy 3) ütközési energiával, amelyek között az MS/MS felvételi idő felosztásra kerül (stepped collision energy, sce módszer; pl. Thermo Orbitrap és Bruker QToF készülékek), vagy az ütközési energia két érték közötti folyamatos lineáris változtatásával (ramp technika; pl. Waters QToF készülék).

A kis  $m/z$  értékeknél megjelenő oxóniumionok (B fragmensek) az N- és O-glikopeptidek MS/MS spektrumára egyaránt jellemző diagnosztikus fragmensek. Ilyenek például az N-acetilhexóزامин és annak egy, illetve két vízvesztett változata ( $m/z = 204, 186, 168$ ), a hexóz-N-acetilhexóزامин ( $m/z = 366$ ), a szialsav ( $m/z = 292$ ) és a hexóz-N-acetilhexóزامин-szialsav ( $m/z = 657$ ). Ezeknek a markerionoknak a megjelenése az MS/MS spektrumban egyértelműen utal arra, hogy glikopeptid prekuzorral van dolgunk (lásd még *Fehérje O-glikoziláció vizsgálata*). Ezáltal egyaránt hozzásegíthetnek hatékonyabb mérési módszer alkalmazásához (lásd ETD és ETHcD) és az N-glikopeptidek megbízhatóbb azonosításához (lásd 12. fejezet).

Az N-glikopeptidek aktiválása és fragmentálása elektronátadással is történhet (lásd 5. fejezet, ETD/ECD fragmentáció). Az elektronbefogás következtében a glikopeptid töltése eggyel csökken, gyökös elektronszerkezet alakul ki, amelynek hatására főként az aminosavlánc  $N-C^{\alpha}$  kötése bomlanak. Az MS/MS spektrumban c- és z'-típusú fragmensek jelennek meg (lásd 7. fejezet), miközben a labilis PTM-ek – így a glikoziláció is – érintetlen marad. Ennek megfelelően az ECD/ETD kiválóan alkalmas a kapcsolódási hely meghatározására, és információt ad az N-glikopeptid aminosav-szekvenciájáról is.

Az ETD és ECD technikák gyenge pontja a kis fragmentációs hatékonyság, ugyanis a nemkovalens kölcsönhatásoknak köszönhetően gyakran disszociáció nélküli elektronátadás történik (ETnoD). Ennek kiküszöbölésére jöttek létre az ETciD és ETHcD hibrid módszerek, melyeket N-glikopeptidek analízisére is gyakran használnak. Lényegük, hogy az elektronátadást követően ütközéses aktiválással (CID/HCD) segítik elő a disszociációt. Ezáltal nő a c- és z'-típusú ionokat létrehozó fragmentáció mértéke, valamint az ETD lépés során nem reagáló prekuzorokból b- és y-ionok is keletkezhetnek. Az utóbbi években, ahogy az ETciD/ETHcD széles körben elérhetővé vált, az N-glikopeptidek azonosítására és a kapcsolódási hely meghatározására az egyik leggyakrabban használt módszer családdá lépett elő.

Az ETD és ETciD/ETHcD fragmentációs technikák hátránya, hogy lassúak – lassabbak, mint a CID/HCD módszerek. Mivel az N-glikopeptideket tartalmazó mintákban található peptid is, gyakran alkalmazunk olyan stratégiát, hogy igyekszünk csak a glikopeptid prekuzorokról felvenni ETD/ETciD/ETHcD MS/MS spektrumot. Ennek érdekében egy előzetes CID/HCD MS/MS felvételt készítünk, és csak a glikopeptidekre jellemző diagnosztikus fragmensek (lásd N-glikopeptidek MS/MS spektruma) megjelenése esetén történik meg az időigényesebb ETD/ETciD/ETHcD MS/MS felvétel (product-dependent triggering módszerek).

Az N-glikopeptidek azonosítása és szerkezetének pontos meghatározása meglehetősen kihívást jelentő feladat, többnyire kombinált tömegspektrometriás megközelítést igényel. A mintától és céltől függően többféle hatékony megoldás létezik. A két leggyakrabban alkalmazott módszer az sceHCD és az ETHcD, melyek közül egy nemrég készült összehasonlító tanulmány N-glikopeptidek vizsgálatára a sceHCD-t találta hatékonyabbnak.<sup>[16]</sup>



## ■ Glikopeptidek modern szerkezetazonosításának szoftveres lehetőségei

Az N-glikopeptidek MS/MS spektrumokból történő azonosítása többnyire bioinformatikai eszközökkel történik.<sup>[17]</sup> Az elmúlt években – részben az egyre jobb tömeg-spektrométereknek és mérési stratégiáknak köszönhetően – ugrásszerű fejlődés következett be ezen a területen. Az új szoftverek fejlesztése virágkorát éli, és folyamatosan jelennek meg a különböző programok hatékonyságát tesztelő, illetve összehasonlító tanulmányok.

Az azonosítást leggyakrabban adatbázis-kereséssel valósítjuk meg a peptidok azonosításával analóg módon (lásd 7. fejezet). Ennek során a keresés szempontjából a peptidlánchoz kapcsolódó glikán egy nagyméretű, variábilis módosításnak tekinthető. A kereséshez a fehérje-adatbázis definiálása mellett egy – a lehetséges oligoszacharid-struktúrákat tartalmazó – glikán-adatbázis megadása is szükséges. Az N-glikopeptidek vizsgálata megköveteli többféle fragmentációs technika vagy paraméterkészlet használatát, ami szükségessé tette a kombinált mérések feldolgozására is alkalmas szoftverek fejlesztését. További kihívást jelent a glikánláncok nagyfokú heterogenitása: a változatos monoszacharid-összetétel és többféle lehetséges kapcsolódási sorrend a keresési tér nagymértékű növekedésével járhat, amelyet a rutin proteomikai fehérjeazonosításra fejlesztett szoftverek nem képesek kezelni. Emellett nehézséget okozhatnak az azonos tömegű összetételek, amilyen pl. a hexóz-NeuAc és fukóz-NeuGc, míg a NeuAc és 2 fukózegység közötti tömegkülönbség egy peptidláncon bekövetkező deamidálásnak feleltethető meg.

A nehézségek ellenére számos, nagy hatékonyságú megoldás létezik, amelyek egyszerre célozzák a mintában lévő glikoformák minél nagyobb hányadának (high coverage) minél nagyobb megbízhatóságú (high accuracy) azonosítását. Működésük alapelve megegyezik a peptidazonosításnál bemutatottakkal: a mért spektrum összevetésre kerül az adatbázis alapján lehetséges N-glikopeptidek elméleti spektrumával. Az adatbázis-keresők közötti különbséget elsősorban az egyezés jószágát jellemző pontozás módja, vagyis a különböző típusú fragmensek (pl. glikán- és peptidfragmensek) figyelembevételének súlyozása, illetve a találatok elfogadási kritériuma jelenti. Ez utóbbi határozza meg, hogy mely találatokat fogadjuk el, és több lehetséges N-glikopeptid szerkezet esetén melyik mellett tesszük le a voksunkat. A pontozási séma megválasztása, különösen sokféle fehérjét tartalmazó, komplex minták esetén, számottevő befolyással lehet a végeredményre.<sup>[18]</sup>

Az adatbázis-keresést felgyorsíthatjuk és megbízhatóbbá tehetjük a karakterisztikus fragmensek segítségével (lásd N-glikopeptidek MS/MS spektruma). Így például a mért MS/MS spektrumokat szűrhetjük oly módon, hogy csak a glikopeptidekre jellemző diagnosztikus oxóniumionok jelenléte esetén vesszük figyelembe őket és keressük le glikopeptidként. Ezt a megközelítést vagy eleve beépítik a szoftverekbe (pl. pGlyco, MAGIC), vagy opcionális funkcióként teszik elérhetővé (pl. Byonic).

A glikoproteomikai adatbázis-keresés kritikus pontja a hibás találati arány (false discovery rate, FDR) meghatározása. A peptidazonosításban bevett megközelítés az ún. target-decoy módszer (lásd 7. fejezet), melynek során randomizált vagy fordított aminosav-szekvenciákon történő keresésből becsülhetjük az FDR értékét. Proteomikai vizsgálatokban tipikusan úgy húzzák meg a találatok elfogadásának határát, hogy 1%-os FDR-t kapjanak. Mivel ennek a stratégiának glikopeptidekre való adaptációja nem triviális, a glikoproteomikában használatos programok jelentős része csak peptidszintű FDR számolást végez, és nem ad becslést a glikánstruktúrára vonatkozóan, így annak megbízhatósága kérdéses marad.

Az alkalmazott mérési technikától, a mintától és a megválaszolandó tudományos kérdéstől is függhet, hogy melyik adatbázis-keresőt érdemes használni. Ráadásul folyamatosan

jelennek meg új szoftverek, és a már meglévők is folyamatos fejlesztés alatt vannak. Az egyes programok eltérő erősségekkel és gyengeségekkel rendelkeznek. Jelenleg a legelterjedtebb keresőprogram a Byonic.<sup>[19]</sup> Egy nemrég készült összehasonlító tanulmány *N*-glikopeptidek azonosítására ezt és a Protein Prospectort<sup>[20]</sup> találta a legjobbnak egy kombinált (lefedettséget és specificitást is tartalmazó) kritériumrendszer alapján. Míg az előbbi egy kereskedelmi szoftver, utóbbinak ingyenes volta előnyös lehet.<sup>[18]</sup> Mindkét programra jellemző, hogy bár annotálja a glikánfragmenseket is, az FDR becslést peptidszekvencia szinten végzi. Ezáltal főként a glikopeptid lefedettség területén mutattak kiemelkedő hatékonyságot. Az IQ-GPA<sup>[21]</sup>, GlycoPat<sup>[22]</sup> és glyXTool<sup>TM</sup><sup>[23]</sup> keresők bizonyultak még kiemelkedőnek, mindhárom programot az elmúlt néhány évben fejlesztették ki. Glikán FDR-t is meghatározhatnak, ennek megfelelően a specificitásra vonatkozó paraméterekben voltak erősebbek az összehasonlítás során. Számos kereső pedig annyira új (pl. MSFragger-Glyco<sup>[24]</sup>, pGlyco<sup>[25]</sup>, StrucGP<sup>[26]</sup>) vagy nem vizsgálták részletesebben (pl. a hazai fejlesztésű GlycoMiner<sup>[27]</sup>), hogy pontos teljesítőképességüknek feltérképezéséhez további tanulmányok szükségesek. Emellett új megközelítések térnyerésének is tanúi lehetünk. Különösen az oligoszacharid struktúra *de novo* szekvenálása és a gépi tanulmányos módszerek alkalmazása tűnik ígéretesnek. Előbbire példa a StrucGP program, mely azáltal, hogy nem használ glikán adatbázist, új oligoszacharid szerkezetek feltérképezésére is lehetőséget ad.

## ■ Mennyiségi meghatározás

Ahhoz, hogy az *N*-glikoziláció biológiai szerepét megértsük és hasznosítsuk betegségek diagnosztikájában, kvantitatív információra is szükségünk van. Ezt többféleképpen határozhatjuk meg: megvalósíthatjuk a lehasított glikánok szintjén, ekkor a mintában lévő összes glikoprotein, illetve glikozilációs hely átlagos mintázatát kapjuk. Vizsgálhatjuk egy adott glikozilációs hely glikoziláltságának mértékét, ekkor viszont a kapcsolódó oligoszacharid struktúrák szerkezete nem határozható meg. A legrészletesebb információt a protein- és helyspecifikus glikozilációs mintázat adja, amelyet tipikusan *N*-glikopeptidek kvantitatív analízisével kapunk.<sup>[28]</sup>

A mennyiségi meghatározás alapjai megegyeznek a peptidok és fehérjék kvantitatív vizsgálatánál alkalmazottakkal (lásd 8. fejezet); a meghatározás történhet abszolút vagy relatív skálán. Előbbihez izotópjelzett standardok használata szükséges, emiatt költségesebb, és főként klinikai alkalmazásokban találkozhatunk vele (pl. mAb-ok). A relatív mennyiségi meghatározás egyszerűbb, felfedező kutatásokban ez terjedt el. Ekkor a glikoziláció mértékének megváltozását nem tudjuk meghatározni, a kapott információ az adott helyhez tartozó glikoformok egymáshoz viszonyított aránya. A peptidokhoz hasonlóan az *N*-glikopeptidek mennyiségi analízise is történhet különféle jelöléses technikákkal vagy jelölésmentesen, illetve adatfüggetlen vagy célzott (MRM/SRM vagy PRM; lásd 6. fejezet) módszerekkel.

*Kémiai jelölés* esetén a proteomikához képest módosított minta-előkészítés javasolt, és még így is probléma lehet, hogy a kapcsolódó glikán miatt a jelölés eltérő hatékonyságú a különböző glikoformokra. Az *izobár jelölés* előnye (pl. TMT, iTRAQ) az összehasonlítható minták nagyobb száma, míg az izotóp jelölés (pl. dimetil) olcsóbb és hatékonyabb. A *metabolikus jelölés* kevésbé elterjedt, mert számos esetben (pl. szövetmetszetek) nem alkalmazható, és csak néhány kondíció összehasonlítására alkalmas. A *jelölésmentes analízis* olcsó, és tetszőleges számú minta összevetésére alkalmas. Ugyanakkor nagy a mérési idő igénye, kevésbé reprodukálható és a kis mennyiségben lévő specíesek nem kerülnek meghatározásra. Utóbbi az *N*-glikopeptidek kis koncentrációjával együtt nagyszámú hiányzó adatot eredményez. Emiatt a kiértékelés nehezebb és az adatok posztprocesszálist igényelnek.

Az N-glikopeptidek célzott módszerrel történő kvantitatív analízise jó szelektivitást és reprodukálhatóságot szolgáltat, ami különösen a kis koncentrációjú glikoformok szempontjából előnyös. Fragmentsként felhasználhatók a B oxóniumionok, valamint  $Y_0$ - és  $Y_1$ -ionok is. Hátránya, hogy mivel egy adott peptidhez tartozó glikoformok kevésbé válnak el kromatográfiásan, limitált az egyszerre vizsgálható glikoformok száma.

A mérésekből a kvantitatív információt többféle szoftverrel kinyerhetjük; a kutatócsoportok jelentős része saját scripteken alapuló egyedi munkafolyamatot alkalmaz. A kísérlet típusa is befolyásolja, hogy mely programok használhatók. Különböző jelölést alkalmazó mérések kiértékelését elvégezhetjük pl. a Byonic/Proteome Discoverer, GPQuest, pGlyco/pQuant, GPSeeker/GPSeekerQuant és SugarQB/Proteome Discoverer szoftverkombinációkkal. Számos program alkalmas N-glikopeptidek jelölésmentes méréseinek elemzésére is, a teljesség igénye nélkül pl. LFQuant, iBAQ, Byologic, Proteome Discoverer, Xtractor, Mascot Distiller, GlycoPattern, Skyline és I-GPA. A fentiek tükrében az elkövetkező években további jelentős fejlesztések várhatók e téren.

### Ajánlott irodalom

1. Stanley P, Moremen KW, Lewis NE, et al. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al, eds. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press Copyright © 2022 The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California; published by Cold Spring Harbor Laboratory Press; doi:10.1101/glycobiology.4e.9. All rights reserved. 2022:103-16.
2. Bañó-Polo M, Baldin F, Tamborero S, et al. N-glycosylation efficiency is determined by the distance to the C-terminus and the amino acid preceding an Asn-Ser-Thr sequon. *Protein Sci*, 2011; 20:179-86.
3. Leroy JG. Congenital disorders of N-glycosylation including diseases associated with O- as well as N-glycosylation defects. *Pediatr Res*, 2006; 60:643-56.
4. Koehler M, Delguste M, Sieben C, et al. Initial Step of Virus Entry: Virion Binding to Cell-Surface Glycans. *Annu Rev Virol*, 2020; 7:143-65.
5. Kailemia MJ, Park D, Lebrilla CB. Glycans and glycoproteins as specific biomarkers for cancer. *Anal Bioanal Chem*, 2017; 409:395-410.
6. Pereira NA, Chan KF, Lin PC, et al. The „less-is-more” in therapeutic antibodies: Afucosylated anti-cancer antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *MAbs*, 2018; 10:693-711.
7. Han L, Costello CE. Mass spectrometry of glycans. *Biochemistry (Mosc)*, 2013; 78:710-20.
8. Riley NM, Bertozzi CR, Pitteri SJ. A Pragmatic Guide to Enrichment Strategies for Mass Spectrometry-Based Glycoproteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2021; 20:100029.
9. Takakura D, Harazono A, Hashii N, et al. Selective glycopeptide profiling by acetone enrichment and LC/MS. *J Proteomics*, 2014; 101:17-30.
10. Domínguez-Vega E, Tengattini S, Peintner C, et al. High-resolution glycoform profiling of intact therapeutic proteins by hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 2018; 184:375-81.
11. Ruhaak LR, Xu G, Li Q, et al. Mass Spectrometry Approaches to Glycomic and Glycoproteomic Analyses. *Chem Rev*, 2018; 118:7886-930.
12. Cooper CA, Gasteiger E, Packer NH. GlycoMod – a software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data. *Proteomics*, 2001; 1:340-9.
13. Campbell MP, Peterson R, Mariethoz J, et al. UniCarbKB: building a knowledge platform for glycoproteomics. *Nucleic Acids Res*, 2014; 42:D215-21.
14. Reiding KR, Bondt A, Franc V, et al. The benefits of hybrid fragmentation methods for glycoproteomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018; 108:260-8.
15. Macias LA, Santos IC, Brodbelt JS. Ion Activation Methods for Peptides and Proteins. *Anal Chem*, 2020; 92:227-51.
16. Riley NM, Malaker SA, Driessen MD, et al. Optimal Dissociation Methods Differ for N- and O-Glycopeptides. *J Proteome Res*, 2020; 19:3286-301.
17. Cao W, Liu M, Kong S, et al. Recent Advances in Software Tools for More Generic and Precise Intact Glycopeptide Analysis. *Mol Cell Proteomics*, 2021; 20:100060.

18. Kawahara R, Chernykh A, Alagesan K, et al. Community evaluation of glycoproteomics informatics solutions reveals high-performance search strategies for serum glycopeptide analysis. *Nat Methods*, 2021; 18:1304-16.
19. Bern M, Kil YJ, Becker C. Byonic: advanced peptide and protein identification software. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2012; Chapter 13:Unit13.20.
20. Baker PR, Trinidad JC, Chalkley RJ. Modification site localization scoring integrated into a search engine. *Mol Cell Proteomics*, 2011; 10:M111.008078.
21. Park GW, Kim JY, Hwang H, et al. Integrated GlycoProteome Analyzer (I-GPA) for Automated Identification and Quantitation of Site-Specific N-Glycosylation. *Sci Rep*, 2016; 6:21175.
22. Liu G, Cheng K, Lo CY, et al. A Comprehensive, Open-source Platform for Mass Spectrometry-based Glycoproteomics Data Analysis. *Mol Cell Proteomics*, 2017; 16:2032-47.
23. Pioch M, Hoffmann M, Pralow A, et al. glyXtool(MS): An Open-Source Pipeline for Semiautomated Analysis of Glycopeptide Mass Spectrometry Data. *Anal Chem*, 2018; 90:11908-16.
24. Polasky DA, Yu F, Teo GC, et al. Fast and comprehensive N- and O-glycoproteomics analysis with MSFragger-Glyco. *Nat Methods*, 2020; 17:1125-32.
25. Zeng WF, Cao WQ, Liu MQ, et al. Precise, fast and comprehensive analysis of intact glycopeptides and modified glycans with pGlyco3. *Nat Methods*, 2021; 18:1515-23.
26. Shen J, Jia L, Dang L, et al. StrucGP: de novo structural sequencing of site-specific N-glycan on glycoproteins using a modularization strategy. *Nat Methods*, 2021; 18:921-9.
27. Ozohanics O, Krenyacz J, Ludanyi K, et al. GlycoMiner: a new software tool to elucidate glycopeptide composition. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008; 22:3245-54.
28. Delafield DG, Li L. Recent Advances in Analytical Approaches for Glycan and Glycopeptide Quantitation. *Mol Cell Proteomics*, 2021; 20:100054.

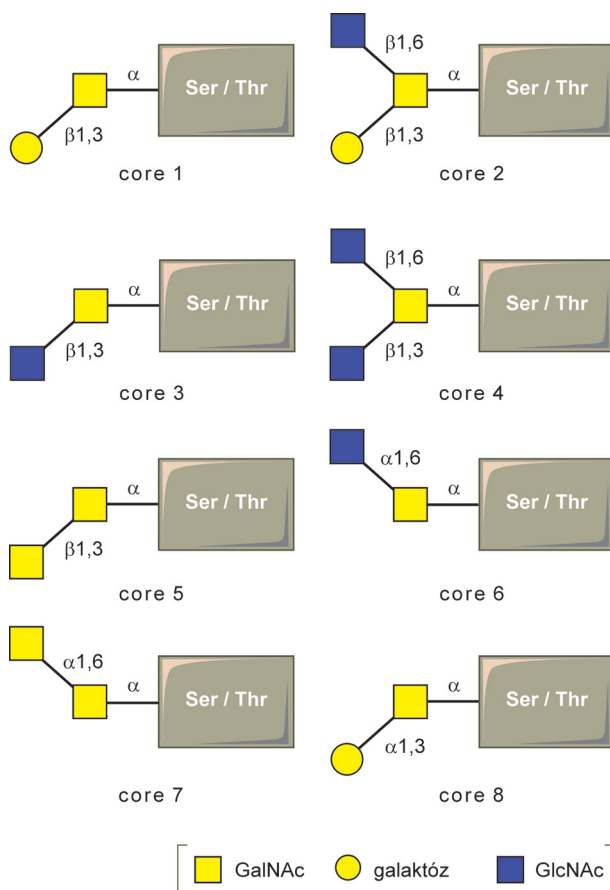
## 12. FEHÉRJE O-GLIKOZILÁCIÓ

Darula Zsuzsanna

A fehérjék O-glikozilációja mind extra-, mind intracellulárisan előfordulhat. Az intracelluláris térben előforduló O-glikoziláció során csupán egyetlen GlcNAc-ot kapcsol az O-GlcNAc-transzferáz (OGT) béta-térállásban a fehérjék Ser/Thr oldalláncára. Ez a módosítás dinamikus és reverzibilis, a foszforilációhoz hasonló szabályozó szerepet tölt be a sejten belül. Feladatát betöltve az O-GlcNAc lehasító enzim (OGA) el is távolítja a módosítást. Az extracelluláris térben előforduló O-glikoziláció a Golgi-rendszerben történik. A fehérjéhez közvetlenül kapcsolódó különböző cukrok felkötésében (iniciáció) számos glikozil-transzferáz vesz részt, mint ahogy a teljes glikánszerkezet kiépítésében is (elongáció). A fehérje adott Ser/Thr oldalláncához közvetlenül kapcsolódó cukor lehet GalNAc, Fuc, Glc, GlcNAc, Man vagy Xyl (lásd 10. fejezet); és ezek többnyire további monoszacharid-egységek kapcsolódásával nagyobb lineáris és elágazó glikánstruktúrákat alkotnak. Ilyen oligoszacharidok a szekretált fehérjéken, illetve membránfehérjék extracelluláris szakaszain, valamint bizonyos sejtszervecskék, pl. Golgi-apparátus, lizoszóma stb. lumenális oldalán fordulnak elő.

A fehérjékhez GalNAc-on keresztül kötődő cukorszerkezetekről E. Eichwald és E. Hoppe-Seyler már a XIX. században beszámolt.<sup>[1]</sup> Felfedezték, hogy testünkben sokféle előfordulnak olyan fehérjék, amelyek GalNAc-alapú cukorláncok százait viselik sűrű csoportokban, és ezeket a fehérjéket *mucinoknak* nevezték el. A későbbi kutatások során kiválglott, hogy ilyen oligoszacharidok nemcsak a mucinokon, hanem számos szekretált vagy membránkötött fehérjén is előfordulnak, és nemcsak sűrűn egymás mellett, hanem jól elkülöníthető pozíciókban is. Ettől függetlenül a GalNAc-alapú oligoszacharidokat most is mucin típusú szerkezetként kategorizáljuk. A mucin típusú O-glikánok számos biológiai folyamatban játszanak szerepet, pl. patogének célsejtbe való behatolásában, vagy éppen egy ilyen támadás kivédésében, szekretált fehérjék, prohormonok enzimatis hasításának szabályozásában, sejtadhézióban, immunreakciókban stb. Fejezetünkben a mucin típusú glikoziláció analízisét fogjuk bemutatni. Az itt ismertetett megfigyelések azonban érvényesek valamennyi O-glikopeptid tömegspektrometriás viselkedésére függetlenül attól, milyen monoszacharid kapcsolódik közvetlenül a fehérjéhez.

A mucin típusú glikoziláción<sup>[2]</sup> belül további alcsoportokat, ún. alapszerkezeteket („core structure”) különböztetünk meg annak alapján, hogy a fehérjéhez alfa térállásban kapcsolódó GalNAc-hoz milyen további monoszacharid egységek kapcsolódnak (12.1. ábra). Ezen alapszerkezetekre újabb építőelemek, például laktózámin egységek kerülhetnek. A láncok többnyire szialsavval záródnak, ez emberben N-acetil-neuraminsav (NeuAc), emlősökben gyakori az N-glikolil-neuraminsav (NeuGc) is. Testfolyadékokban elsősorban core-1 és core-2 O-glikánokkal dekorált glikoproteinek fordulnak elő, a szöveti fehérjék glikán repertoárja változatosabb. Az ABO vércsoport antigének megjelennek a vörösvértestek felszínén úgy fehérjéken, mint glikolipideken, de kapcsolódhatnak a szekretált és membrán-kötött fehérjék N- és O-glikánjaihoz is. Ez utóbbinak előfeltétele, hogy az egyén rendelkezzen dominánsan öröklődő, aktív fukozil-transzferáz 2 (FUT2) enzimmel („szekretor” státusz); az emberiség 80%-a ebbe a kategóriába tartozik.



**12.1. ábra.** A mucin típusú O-glikoziláció 8 alapszerkezete

Az N-glikozilációhoz hasonlóan, az O-glikozilációra is jellemző a heterogenitás. Egy adott módosítási hely általában csak részben glikozilált, és az is változó, hogy milyen mértékben (makroheterogenitás). Ugyanakkor több különböző glikán is dekorálhatja ugyanazt a módosítási helyet, viszont az egyes szerkezetek előfordulása és aránya is pozíciófüggő (mikroheterogenitás).

Az O-glikoziláció tömegspektrometriás jellemzése történhet glikán, glikopeptid és natív glikoprotein szinten (lásd 11. fejezet), helyspecifikus információt legegyszerűbben glikopeptidek vizsgálatával nyerhetünk.

## Glikopeptidek vizsgálata

### O-glikopeptidek dúsítása

Az ún. *bottom-up* (lásd 2. fejezet) glikoproteomikai megközelítésnél a glikoproteinek proteolízissel vagy kémiai hasítással előállított emésztési elegyeit vizsgáljuk. Érdekes észben tartani, hogy a makro- és mikroheterogenitás miatt a glikozilált szekvenciák számos különböző formában, így a módosítatlan peptidekhez képest jelentősen kisebb mennyiségben

lehetnek jelen, azaz komplex minták esetén mindenképp szükséges a glikopeptidek dúsítása is. Ez történhet glikánkötő fehérjék, ún. lektinek segítségével végzett affinitás tisztítással, esetleg hidrophil kölcsönhatáson alapuló kromatográfiával (HILIC és ERLIC, lásd 4., 9. és 11. fejezetek), immobilizált fémion affinitás kromatográfiával (IMAC) vagy  $\text{TiO}_2$ -on történő izolálással.<sup>[3]</sup>

A lektinek sorából kiemelkedő figyelmet érdemel a búzacsíra agglutinin (WGA, wheat germ agglutinin), amely általánosan használható glikopeptid dúsításra, mivel a legváltozatosabb N- és O-glikánokkal módosított peptidek kifogására alkalmas.<sup>[4-5]</sup> Ezt a lektint akkor érdemes használni, ha átfogó képet szeretnénk alkotni egy rendszer glikozilációjáról. A Jacalin és a földimogyoró agglutinin (PNA, peanut agglutinin) lektinnel a leggyakoribb, mucin-1 glikánokat viselő glikopeptidek dúsíthatók. Viszont a földimogyoró agglutinin már a mucin-1 triszacharidot ( $\text{NeuAc}(\alpha 2,3)\text{Gal}(\beta 1,3)\text{GalNAc}\alpha$ ) sem köti hatékonyan, míg a Jacalin kötéshez a GalNAc 6-os hidroxiljának szabadnak kell lennie, így a mucin-1 tetraszacharidot [ $\text{NeuAc}(\alpha 2,3)\text{Gal}(\beta 1,3)\text{GalNAc}(\text{NeuAc}(\alpha 2,6))$ ] hordozó peptideket ez a lektin nem fogja ki.<sup>[6]</sup> Tehát az eredményesebb dúsítás érdekében szükséges a szialsavak neuraminidáz kezeléssel történő eltávolítása. Ez a lépés egyben a mikroheterogenitás csökkentését is jelenti, így nagyobb esélyünk van a glikozilációs helyek sikeres azonosítására. A mucin-1 szerkezetek  $\beta$ -galaktozidáz segítségével tovább egyszerűsíthetők, így csupán a GalNAc módosítás marad a peptideken. Hogy ugyanilyen glikopeptideket kapjunk a mucin-2 szerkezetekből, ahhoz még egy enzim, a  $\beta$ -N-acetil-hexóزامينيدáz is szükséges. Ezek a glikoformák izolálhatók szójabab (SBA, soybean agglutinin) vagy szöszös bükköny (VVA, *Vicia villosa* agglutinin) agglutininrel. Ezen lektineknek kulcsszerepük van az ún. Simple Cell kutatásokban,<sup>[7]</sup> ahol a glikánelongáció blokkolásával csak  $\alpha$ -GalNAc, illetve  $\text{NeuAc}(\alpha 2,6)\text{GalNAc}\alpha$  cukrokkal (az ún.  $T_n$ , illetve  $ST_n$  antigénnel) módosított O-glikoproteinek képződnek. Ezenkívül fontosak lehetnek a rákkutatásban, mivel bizonyos kutatások arra utalnak, hogy a  $T_n$  antigén mennyisége tumoros állapotokban megnövekszik.

HILIC-kel elsősorban többszörösen módosított vagy nagyobb glikánstruktúrákat hordozó O-glikopeptidek dúsíthatók. Az IMAC- vagy  $\text{TiO}_2$  alapú dúsítás elsősorban szialsavat hordozó glikopeptidek esetén használható, bár a kölcsönhatás részben hidrophil jellege miatt nagyméretű aszialo-glikánokat hordozó glikopeptideket is lehet így izolálni.<sup>[8]</sup> Szialoglikoproteineket viszonylag szelektíven lehet dúsítani kihasználva azt, hogy a szialsav kovalensen kötődik hidrazin gyantához, endoproteáz kezelés után a glikopeptid elereszthető, ha savas kezeléssel bontjuk a szialsav glikozidos kötését.<sup>[9]</sup> Természetesen ezzel a módszerrel is sok információt veszítünk a mikroheterogenitásról.

Fontos megemlíteni, hogy a fent említett dúsítási módszerek többsége N-glikopeptidek (sőt bizonyos esetekben foszfopeptidek, lásd 9. fejezet) izolálására is alkalmas, ezért komplex elegyek esetén nagyban megkönnyíti a minta analízisét, ha az N-glikánokat PNGáz-F enzimrel eltávolítjuk. Mivel a PNGáz-F a kisebb, csonkolt N-glikánokat nem hasítja hatékonyan,<sup>[10]</sup> mindenképpen számíthatunk némi N-glikopeptid interferenciára az O-glikopeptidek analízise során.

## O-glikopeptidek MS/MS fragmentációja

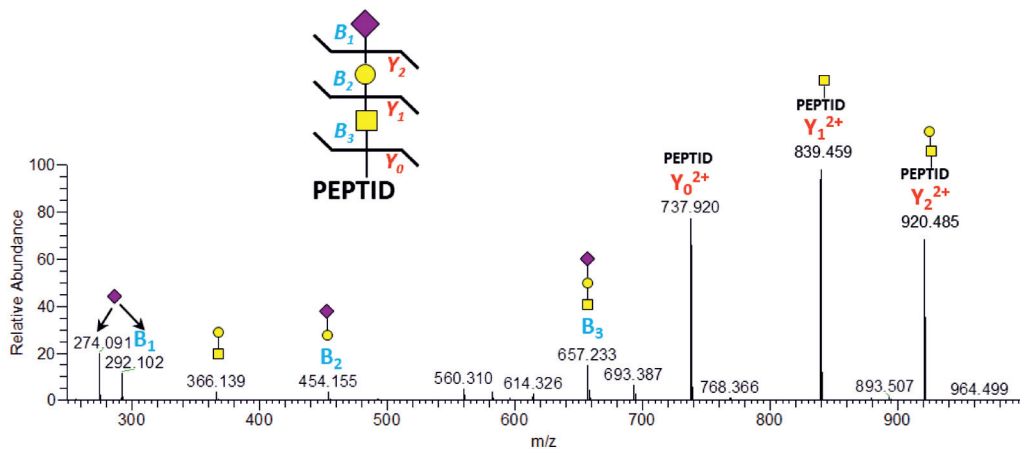
A (dúsított) O-glikopeptid-elegyek tömegspektrometriás jellemzését a fehérje-azonosításhoz bemutatott LC-MS/MS analízissel végezzük, azaz a peptideket fordított fázisú oszlopon választjuk el, majd adatfüggő MS/MS analízist végzünk. Az adatok értelmezésénél nagyon fontos tisztában lennünk azzal, hogy az alkalmazott fragmentációs technikától függően a glikopeptidek nagyon eltérő fragmentációs mintázatot mutathatnak.<sup>[11]</sup> Az ütközéses akti-



válásnál (CID) a gyengébb kötések hasadnak először. Miután a glikozidos kötés gyengébb a peptidkötésnél, így a cukorfragmentáció mindenképp domináns lesz. A dominancia mértéke függ természetesen attól, hogy ioncsapdában vagy ütközési cellában történik az aktiválás, ez utóbbi esetben az ütközési energia nagyságától és a glikoziláció mértékétől is. Fogalmazhatnánk úgy is, hogy a cukor/peptid aránytól függ, de feltehetően nem mindegy, hogy azonos monoszacharid-összetétel mellett hány glikán kötődik egy adott peptidhez. Az alternatív elektrontranszfer-aktiválás elkerüli ezt a buktatót, mert az ütközéses aktiválásban törekény módosítások a helyükön maradnak, de ezért jelentősen alacsonyabb hatásfokú fragmentációval fizetünk (lásd 7. fejezet).

Vegyük sorra, hogy milyen információkat nyerhetünk az egyes fragmentációs technikával az O-glikopeptidekről!

1. Az ioncsapdákbán egyszeres kötéshasadások történnek (rezonancia aktiválás), így első sorban a glikozidos kötések hasadnak (12.2. ábra), tehát főképp B- és Y-fragmenseket detektálunk (lásd 10. fejezet). Az Y-ionok alapján a spektrumból megállapítható a glikán összetétele, és a monoszacharidok kapcsolódási sorrendjéről is nyerhető információ. A megfelelő B-fragmensek további megerősítést, információt szolgáltathatnak erről, annak ellenére, hogy a prekursor  $m/z$  értékének függvényében rendszerint elvesszítjük a kisebbeket (lásd 7. fejezet). Monoglikoziláció esetén intenzíven megjelenik a teljes glikán gázfázisú eliminációjával képződő, módosítatlan peptidet képviselő  $Y_0$ -ion, amely felfedi a peptid molekulatömegét. A peptid szekvenciája, illetve a módosítás helye viszont nem határozható meg, illetve az sem derül ki, hogy egy adott glikán-összetétel egyetlen nagyobb, vagy több kisebb glikán módosításnak felel meg. Ez az O-glikoziláció esetén releváns probléma, mivel gyakran egy peptiden belül több lehetséges glikozilációs hely is van, és az O-glikoziláció gyakran többszörös módosításként, szomszédos vagy egymás közelségében levő aminosavakon jelenik meg (pl. a humán hemopexin N-terminális triptikus peptidje, a processzált szekvencia (1-26) szakasza,



**12.2. ábra.** O-glikopeptid CID spektruma (prekursor  $m/z$ : 711,027,  $z=3$ ). A glikozidos kötések hasadása a domináns fragmentációs esemény. Az Y ionsorozatból és az alacsony tömegtartományban megjelenő cukor oxónium ionok alapján megállapítható a glikán szekvenciája: NeuAcHexHexNAc, ami megfeleltethető a monoszialo-mucin-1 alapszerkezetnek (NeuAcGalGalNAc). A peptid szekvenciája és a módosítás helye nem határozható meg.

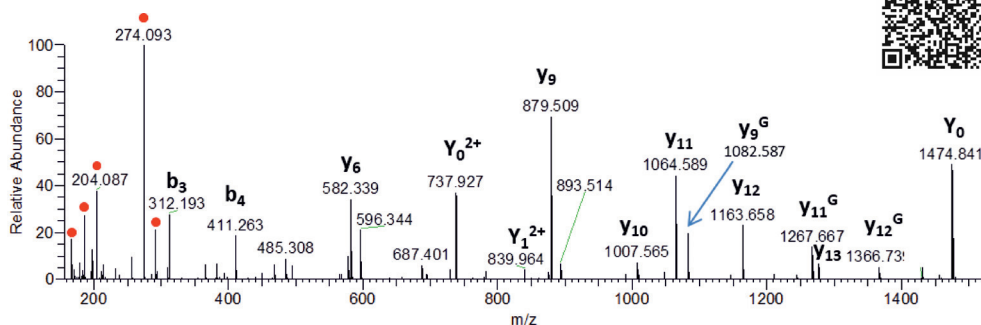
akár négyszeresen is glikozilált), és bizonyos glikánkombinációk többféleképp is értelmezhetők; hogy a legegyszerűbb példát említsük, két monoszialo-mucin-1 szerkezet ( $2 \times \text{NeuAcGalGalNAc}$ ) additív tömegét és összetételét tekintve megegyezik egyetlen diszialo-mucin-2 szerkezettel ( $\text{NeuAcGal}(\text{NeuAcGlcNAc})\text{GalNAc}$ ).

- Ütközési cellában kivitelezett CID során (pl. QToF CID vagy Orbitrap HCD fragmentáció, lásd 7. fejezet) az elsődleges hasítási termékek további ütközésnek vannak kitéve, így tovább fragmentálódnak. A többszörös kötéshasadások miatt gyakran már nem tudunk következtetni a monoszacharidok kapcsolódási sorrendjére és azt sem tudjuk eldönteni, hogy egy vagy több glikán van a peptiden. A magasabb tömegű Y-fragmensek eltűnhetnek, viszont a többszörösen glikozilált peptidok is produkálhatnak jelentős  $Y_0$ - és  $Y_1$ -ionokat. A B-ionok is kevesebb információt hordoznak az eredeti oligoszacharid szerkezetéről, alacsonyabb ütközési energiánál is többnyire csak két, esetleg három monoszacharid-egységből álló B-fragmenseket figyelhetünk meg. Ugyanakkor az alacsony tömegtartományban megjelenő cukor-oxónium-ionok és azok további fragmensei diagnosztikus értékkel rendelkeznek (12.1. táblázat).

12.1. táblázat. Glikopeptidek CID spektrumában megfigyelhető cukor-oxónium-ionok

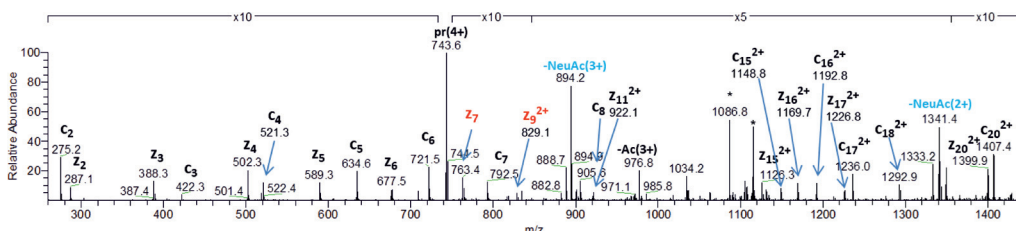
szacharid	<i>m/z</i>
HexNAc	204, 186, 168, 144, 138, 126
NeuAc	292, 274, 256, 197
NeuGc	308, 290
HexNAcHex	366
HexNeuAc	454
HexNAcNeuAc	495
HexNAcHexNeuAc	657

a vastagon szedett ionok jellemzően nagyobb intenzitással jelennek meg



12.3. ábra.  $m/z$ : 711,027,  $z=3$  ionról készült HCD spektrum. Glikopeptid jelenlétére utalnak a pirossal jelölt diagnosztikus HexNAc és NeuAc oxóniumionok. A peptid szekvenciája (TPIVGQPSIPGGPVR) meghatározható az y-ionokból, amit megerősít a két töltésállapotban is megjelenő deglikozilált peptid ion ( $Y_0$ ). A glikán additív tömege 656 Da, ami megfelel a mucin-1 alapszerkezetnek ( $\text{NeuAcGalGalNAc}$ ). Az  $m/z$  1082,587 ion megfelel a GalNAc-ot hordozó  $y_9$ -ionnak, tehát a peptiden belüli két lehetséges módosítási hely közül a Ser-8 módosított. A bal felső indexben G-vel jelzett ionok HexNAc módosítást hordoznak.

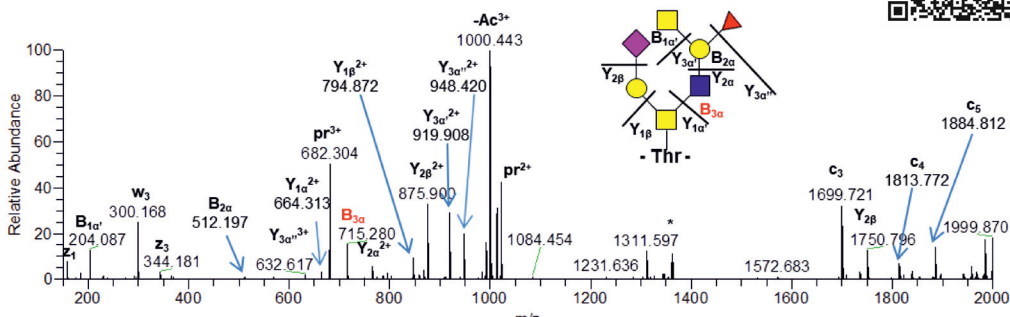




**12.5. ábra.** O-glikopeptid ETD spektruma (prekursor  $m/z$ : 743,361,  $z=4$ ). A c- és z-ionokból meghatározható a peptid szekvenciája: RTFVLSALQPSPTHSSNTQR. A glikán additív tömege 656 Da, ami megfelel a mucin-1 trisacharidnak (NeuAcGalGalNAc). A módosítás helye a Thr-13, melyet a módosítatlan z<sub>7</sub>- és a glikozilált z<sub>9</sub>-ionok bizonyítanak (pirossal kiemelve). A csillaggal jelölt ionok egy koelutáló 2+ peptidből származnak. A prekursor ionok (pr) szílsavvesztését jelző ionokat kékkel kiemeltük.

a glikán(ok) tömege és a módosítás(ok) helye is. Itt kell azonban megemlítenünk, hogy az ETD az ütközéses aktiválásnál jóval kisebb hatásfokú, és elsősorban nagy töltéssűrűségű (kis  $m/z$  értékű), sokszorososan töltött prekursorokra működik jól.

4. A legteljesebb információ egyetlen spektrumon belül az ETD és HCD kombinációjával nyerhető. Jelenleg ez a technika nagy felbontással csak a Thermo Scientific bizonyos készülékein érhető el. Az analízis első fázisában elektrontranszfer-disszociáció történik, majd az összes jelenlévő iont, beleértve a nem fragmentálódott prekursor ionokat is, alacsony ütközési energiával aktiváljuk (HCD).<sup>[12]</sup> Ebben a folyamatban az ETD-vel képződött ionok zöme változatlan marad, de a prekursor ionok maradéka fragmentálódik. Az O-glikopeptidok EthCD spektruma nagyjából úgy néz ki, mint egy ETD és CID spektrum szuperpozíciója: a peptidszekvenciára jellemző c- és z-ionok, valamint a glikánfragmentációval képződő B- és Y-ionok dominálnak (12.6. ábra). Ez utóbbiak jel-

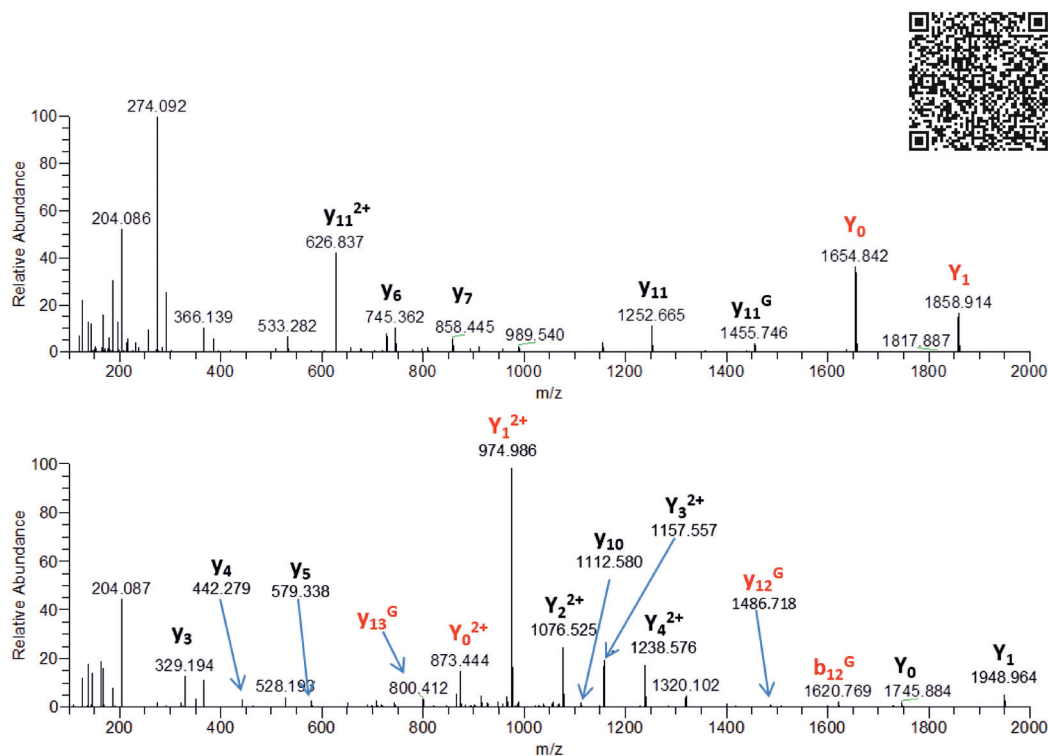


**12.6. ábra.** O-glikopeptid EthCD spektruma (prekursor  $m/z$ : 746,661,  $z=3$ ). A c- és z-ionokból meghatározható a peptid szekvenciája: IPTNAR. A glikán additív tömege 1370 Da, ami megfelel egy A vércsoport antigén hordozó mucin-2 heptasacharidnak. A glikán fragmentációval képződő B<sub>3a</sub> ion igazolja, hogy a vércsoport antigén a glikán alfa-láncán levő GlcNAc-hoz köthető. A w<sub>3</sub>-ion az Asn oldallánc fragmentációjával képződik.

lemzően egyszeres kötéshasadással képződnek, és akár az intakt glikán oxóniumionja is megfigyelhető, feltéve, hogy kis HCD ütközési energiát („supplemental activation HCD NCE”) használunk. Erősebb HCD aktiválásnál már a többszörös kötéshasadások felé tolódik el a fragmentáció, így értékes szerkezeti információt veszítünk. Detektálhatunk továbbá a peptidkötés hasadásával létrejövő *b*- és *y*-ionokat, és időnként *w*-ionok is megjelennek, melyek a *z*-ionokból a béta-szubsztituens leválásával keletkeznek. Összességében tehát egy jó minőségű EThcD spektrumból kiolvasható a peptid szekvenciája, a glikán(ok) építőelemeinek egymáshoz viszonyított kapcsolata és a módosítás(ok) helye is.

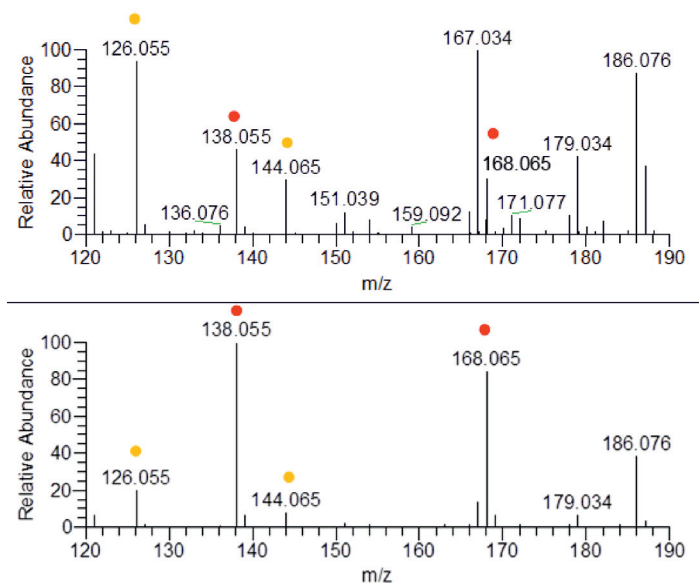
### N- és O-glikopeptidek megkülönböztetése

Az olvasó bizonyára már észrevette, hogy az *N*- és az *O*-glikopeptidek MS/MS fragmentációja sok hasonlóságot mutat. Hogyan dönthető akkor el, hogy egy glikopeptidről felvett MS/MS spektrum *N*- vagy *O*-glikopeptidhez tartozik? A legerősebb bizonyíték a HCD spektrumokban megfigyelhető, glikán fragmentációból eredő ionok intenzitás-viszonya. *O*-glikopeptideknél a teljes glikán gázfázisú eliminációja a preferált fragmentációs esemény, míg *N*-glikopeptideknél az Asn-GlcNAc kötés sokkal stabilabb. Ezért az *N*-glikopeptideknél



**12.7. ábra.** A glikán fragmentáció alapján megkülönböztethetők az *N*- és *O*-glikopeptidek. A felső panelen a DVSTPPTVLDPNFPR mucin-2 hexaszachariddal módosított *O*-glikopeptid (prekursor *m/z*: 989,773, *z*=3), az alsó panelen a YWLGNGSFIEHLPGR Man5GlcNAc2 heptaszachariddal módosított *N*-glikopeptid (prekursor *m/z*: 988,105, *z*=3) HCD spektrumai láthatók. A jobb felső indexben G-vel jelzett ionok HexNAc módosítást hordoznak.

jellemzően az  $Y_1$ -ion dominál, az  $O$ -glikopeptideknél az  $Y_0$ -ion sokkal intenzívebb (12.7. ábra). Másrészt a HexNAc  $m/z$  204.0867 oxóniumionból képződő fragmens ionok intenzitásmintázata is eltérő:  $N$ -glikoziláció esetén a GlcNAc-ból az  $m/z$  138 és 168 ionok képződnek inkább, míg  $O$ -glikoziláció esetén a GalNAc jellemzően  $m/z$  126 és 144 fragmenseket produkál (12.8. ábra).<sup>[13]</sup> A megfelelő intenzitásokból képzett  $(138+168)/(126+144)$  hányadosból megállapítható, hogy GlcNAc vagy GalNAc van-e jelen, azaz  $N$ - vagy  $O$ -glikopeptidről készült az MS/MS spektrum (természetesen GlcNAc-ot és GalNAc-ot egyaránt hordozó glikopeptideknél nem ennyire egyszerű a helyzet).



**12.8. ábra.** A HexNAc-ból képződő fragmens ionok intenzitáseloszlása különböző GalNAc és GlcNAc esetén. A GalNAc esetén (felső panel) az  $m/z$  126 és 144 ionok erősebbek, míg a GlcNAc (alsó panel) dominánsan  $m/z$  138 és 168 ionokat ad. Ezek alapján a mucin-1  $O$ -glikoziláció megkülönböztethető az  $N$ -glikozilációtól.

### **$O$ -glikopeptidek azonosítása adatbázis kereséssel**

A peptidek azonosításához hasonlóan a glikopeptideket is adatbázis kereséssel szoktuk azonosítani. Az  $O$ -glikopeptidek dúsítására használható módszerek közül egyik sem olyan szelektív, hogy ne kellene több-kevesebb nemglikozilált háttérre számítani, ami az adatbázis kereséssel kapott azonosítások megbízhatóságát csökkenti. Ezen viszonylag könnyen segíthetünk úgy, hogy adatbázis lekeresés előtt elkülönítjük a glikopeptidekről felvett spektrumokat. Az ütközési aktiválással gyűjtött adatoknál ez elég egyszerű, mivel az  $N$ - és a mucin típusú  $O$ -glikánokban mindig van HexNAc, amely(ek) oxóniumionja ( $m/z$  204.0867) intenzív és a modern készülékek tömegfelbontása mellett mással nem összekeverhető (lásd 10. fejezet). Ennek jelenlétére lehet szűrni az HCD csúcslistákat (pl. a Protein Prospector MS-Filter programja segítségével). Ezt az egyedi fragmens iont hasznosítja az ún. termékion-függő ET(hc)D adatgyűjtési stratégia is: egy prekursor ionról csak akkor készül ET(hc)D spektrum, ha ugyan-ezen prekursor HCD spektrumában megfigyelhető a felhasználó által megadott ion vagy ion kombináció. Glikopeptideknél úgy állítjuk be a méréseket, hogy a HexNAc-specifikus  $m/z$  204.0867 bizonyos intenzitású detektálása nélkül (pl. a 10–20 legintenzívebb HCD frag-



mens ion között kell lennie) nem kezdődhet ET(hc)D analízis. Itt tehát nem az adatok utólagos szűréséről van szó, hanem már az adatgyűjtésnél biztosítjuk, hogy csak glikopeptidekről készüljön ET(hc)D spektrum.

A glikopeptidok két különböző biopolimer kapcsolódásával jönnek létre, így két különböző adatbázisból kell az összetartozó alkotóelemeket azonosítani, hogy helyesen írjuk le szerkezetüket. Mint fentebb ismertettük, az alkotóelemek karakterisztikus fragmentációja is különböző, ami nem teszi a feladatunkat egyszerűbbé. A keresésekhez mind egy fehérje-, mind egy glikán-adatbázist definiálnunk kell, tehát tudnunk kell, hogy milyen glikánok lehetnek jelen az analizálandó elegyben (erre majd később visszatérünk). Mi mindenesetre azt tanácsolnánk, hogy első megközelítésben csak a leggyakrabban előforduló cukorszerkezeteket engedélyezzük változó módosításként. Emlős és humán mintákban is leginkább mucin-1 és -2 alapszerkezeteket láthatunk, azaz a glikánadatbázis tagjai HexNAcHexNeuAc<sub>1-2</sub> és HexNAc<sub>2</sub>Hex<sub>2</sub>NeuAc<sub>2</sub> legyenek. Amennyiben a terminális szialsavakat eltávolítottuk (vagy a glikopeptid izolálásakor, vagy neuraminidáz segítségével), akkor természetesen már csak két szerkezettel kell számolnunk. Ennek a megközelítésnek az az egyszerű indoka, hogy feltehetően minden O-glikoprotein módosításai között szerepelnek a leggyakoribb glikánok. A tágabb oligoszacharid-adatbázissal végzett keresés pedig eredményesebb lehet, ha egy szűkített fehérjelistával kell csak végrehajtanunk (erre majd visszatérünk).

Számos glikopeptid- analízisre alkalmas szoftver létezik. Ezek a lekereső programok többnyire a peptidrész meghatározásával foglalkoznak először. Ez pedig nem megoldható a peptidgerinc hasadása, azaz számos peptidfragmens képződése nélkül. Azaz pl. az ioncsapdában felvett glikopeptid CID spektrumok erre a célra nem használhatók. A módosított szekvencia azonosítása tulajdonképp magában hordozza az oligoszacharid méretének (mért molekulatömeg-peptidtömeg) és így összetételének valószínű meghatározását is. Az így meghatározott monoszacharid-kompozíció alapján a lekereső program jelenti, hogy egy vagy több glikán kötődik a peptidhez, és a módosítás helyét is megadhatja. A peptidazonosításokhoz hasonlóan ezeket a találatokat a szoftverre jellemző pontszámmal, és a megbízhatóságát valamilyen szinten jelző, valószínűsítésszámításon alapuló mérőszámmal listázzák. A glikozilációs hely meghatározásának megbízhatóságát vagy annak hiányát külön jelzik (*lásd később*). Ilyen módon, csupán a leggyakoribb módosításokat megengedve, megismerhetjük a mintánkban levő glikoproteinek jelentős részét.

További vizsgálódásainkat már egy tágabb, remélhetőleg „teljes” adatbázissal végezzük. Ebben nagy segítségünkre lehet, ha azonos mintából korábban glikánanalízissel feltérképezték a várható szerkezeteket. Ugyanakkor a potenciális cukorszerkezetek listáját szakirodalmi adatokból is összeállíthatjuk. Ennek hiányában ütközéses aktiválással felvett spektrumokból mi magunk is készíthetünk egy glikán-adatbázist, ha végzünk egy ún. „wild-card” keresést, ahol nem definiáljuk előre, hogy milyen módosítások lehetnek a peptiden, de megadhatjuk, hogy mely aminosavakon várunk módosítást egy adott tömegtartományban. A keresés eredménye egy peptid+módosítás-tömeg lista, melyben a gyakran előforduló additív tömegeket érdemes megvizsgálni, hogy a bioszintetikus utak figyelembevételével értelmezhetők-e glikánként.

Természetesen az adatértelmezést nagyban egyszerűsíteni, ha csak egyszeresen glikozilált peptidokat kellene analizálnunk, illetve a módosított aminosav peptiden belüli pozíciója előre ismert lenne. Az elmúlt években felfedeztek jónéhány bakteriális endoproteázt, melyek specifikusan csak O-glikoproteineket hasítanak. Mivel a hasítási hely jellemzően az O-glikozilált pozíciók N- vagy C-terminálisa, a legnagyobb hozadék az lehet, hogy a módosítási helyek akár ETD fragmentáció nélkül is „meghatározhatók”. Ez sajnos csak megszorítá-



sokkal igaz, mivel előfordulhat, hogy sűrűn glikozilált fehérjerégiókban nem történik meg az összes helyen a hasítás, vagy a hasítás helye nem közvetlenül a módosított aminosav. További limitáció, hogy ezen enzimek egy része csak bizonyos O-glikán-struktúrákat tolerál, míg mások erősen szelektálnak a glikozilációs hely környékén előforduló aminosavakra. Egyelőre ezeket az enzimeket tisztított O-glikoproteinek jellemzésére használták, komplex mintákra való alkalmazhatóságuk kérdéses. Előfordulhat, hogy sűrűn glikozilált fehérjeszakaszokból a hagyományos adatfüggő LC-MS/MS analízissel nem kompatibilis, illetve kevésbé egyedi, rövid peptideket kapunk, míg az egymástól távoli glikozilációs helyeket képviselő peptidek túlságosan is nagyok lesznek. Ez utóbbi áthidalható kombinált enzimhasználattal, pl. ha az O-glikoproteinázzal kapott peptidelegyeket tovább emésztjük tripszinnel.<sup>[14]</sup> Véleményünk szerint O-glikoproteinázok használatával is megkerülhetetlen az ETD analízis az O-glikozilációs helyek, illetve az ezeket dekoráló glikánstruktúrák egyértelmű meghatározásához.

Az alábbiakban három O-glikoziláció adatértelmezésre alkalmas szoftver lényeges tulajdonságait foglaltuk össze.

Előnyök	Hátrányok
<b>Protein Prospector</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>– csak akkor adja meg a glikoziláció helyét, ha arra talál bizonyítékot a spektrumban</li> <li>– megadja a módosítási hely meghatározásának megbízhatóságát (SLIP score [15])</li> <li>– a módosítások kategorizálhatók „gyakori” és „ritka” csoportokba, előfordulásuk korlátozható, ami a lehetséges kombinációk limitálásával megbízhatóbb eredményekhez vezethet (csak ETD adatok esetén releváns)</li> <li>– a „mass modification” opció használatával felmérhető a különböző tömegű aminosav-specifikus módosítások gyakorisága, ennek segítségével optimalizálható az adatbázis keresésre használt glikán adatbázis</li> <li>– ingyenes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– a fragmentációs adatokat (HCD, EThcD) külön kezeli</li> <li>– HCD adatoknál a glikozilációt semleges-vesztésként kell definiálni, ami megnehezíti a glikán adatbázis felépítését (az összes glikán összes lehetséges kombinációját definiálni kell); továbbá így a módosítás helye sem szűkíthető le csak a valóban glikozilálható aminosavakra (tekinthetjük ezt beépített negatív kontrollnak)</li> <li>– a peptid fragmentációjából származó ionokat veszi csak figyelembe az értékelésnél: az azonosítások gyengébbnek tűnnek, mivel a glikán fragmentációból származó ionokat nem értelmezi (de ezek utólag jelölhetők)</li> </ul>
<b>Byonic<sup>[16]</sup></b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>– HCD adatoknál mind a teljes, mind a részleges glikán veszteséssel keletkező fragmensi onokat automatikusan értelmezi</li> <li>– megadja a módosítási hely meghatározásának megbízhatóságát (Delta Mod score<sup>[16]</sup>, lásd hátrányok is!)</li> <li>– a módosítások kategorizálhatók „gyakori” és „ritka” csoportokba, előfordulásuk korlátozható, ami a lehetséges kombinációk limitálásával megbízhatóbb eredményekhez vezethet</li> <li>– a „wild card” opció használatával felmérhető a különböző tömegű aminosav-specifikus módosítások gyakorisága, ennek segítségével optimalizálható az adatbázis keresésre használt glikán-adatbázis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– a fragmentációs adatokat (HCD, EThcD) külön kezeli</li> <li>– a peptid és a glikán fragmentációjából származó ionokat együttesen veszi figyelembe a pontozásnál: a HCD alapú azonosítások megbízhatósága kérdéses (előfordulhat, hogy nincs peptidszekvenciát bizonyító adat)</li> <li>– akkor is módosítási helyet rendel az azonosításokhoz, amikor nincs erre utaló egyértelmű adat a spektrumban</li> <li>– éves licensz díjat kell fizetni a használatáért</li> </ul>

## O-Pair [17]

<ul style="list-style-type: none"> <li>– HCD- és ETD-adatokat együtt kezeli</li> <li>– megadja a módosítási hely meghatározásának megbízhatóságát (Glycan Localization Level specifikáció és localization score)</li> <li>– jelzi, ha a peptid N-glikozilációs konszenzus motívumot tartalmaz, azaz van esély O-glikoziláció helyett vagy mellett N-glikozilációra is</li> <li>– ingyenes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– a módosítások nem rangsorolhatók „gyakori” és „ritka” csoportokba, ami szignifikánsan növeli a lehetséges kombinációk számát és csökkenti az azonosítások megbízhatóságát</li> <li>– az ETD-adatokat csak a HCD-azonosítások megerősítésére használja, gyenge HCD-spektrum esetén jó ETD-adatok mellett is sikertelen a glikopeptid-azonosítás, sőt félreértelmezés is előfordul</li> <li>– nagyobb adatbázis használata esetén lassú a lekeresés</li> </ul>
--	---

Az O-glikopeptidek kvantitatív elemzésére elvileg a 8. fejezetben bemutatott összes technika alkalmazható. Viszont ahogy azt fentebb bemutattuk, az izomer glikopeptidek kromatográfiás elválasztása, illetve tömegspektrometriás megkülönböztetése korántsem megoldott analitikai kihívás. Ezért az összehasonlító vizsgálatok lehetősége erősen korlátozott, sok esetben nem tudunk egyértelműen meghatározott egyedi glikánszerkezeteket és pontos glikozilációs hely(ek)et rendelni egy adott cukorösszetételhez a peptiden. További limitáció, hogy az O-glikopeptidek dúsítására használt módszerek reprodukálhatósága erősen befolyásolja az eredményeket (pl. az immobilizált lektin oszlopok affinitása a használat során fokozatosan csökken).

## Intakt O-glikoproteinek vizsgálata

Természetesen a legátfogóbb jellemzést akkor kaphatjuk, ha a glikoproteinek tömegspektrometriás vizsgálatát enzimés kezelés nélkül, természetes állapotukban tudjuk kivitelezni, hiszen így felderíthető, hogy milyen szekvencia variánsok, illetve poszttranszlációs módosítás-kombinációk vannak jelen egy adott mintában (proteoformák). Ilyen vizsgálatokat egyelőre még csak tisztított rekombináns fehérjéken, vagy egyszerű fehérjeelegyeken végeznek. Komplexebb minták MS jellemzését erősen korlátozza, hogy keverékek analízisének a különböző fehérjéből származó jelek erősen átlapolódnak, nagyon megbonyolítva az adatok értelmezését, másrészt az egyes fehérjék egymás ionizációját befolyásolják, ezért a kisebb mennyiségben jelenlevő fehérjét esetleg nem is detektáljuk (*ionsuppresszió, lásd 5. fejezet*). A peptidek elválasztására használható kromatográfiás eljárások használhatók fehérjékre is, de közel sem olyan hatékonysággal/felbontással, mint peptidekre. A fenti megszorítások természetesen bármilyen fehérjekeverékre vonatkoznak, de gondoljunk bele, mennyire bonyolítja a helyzetet a glikozilációra jellemző makro- és mikroheterogenitás! Ezért a fehérjeszintű tömegspektrometriás méréseket glikoproteinek esetén mindig kiegészítik glikán és/vagy peptid szintű analízisekkel is.<sup>[18]</sup>

## O-glikán-analízis

Fontos különbség az N-glikánok analíziséhez képest, hogy O-glikánok eltávolítására nem létezik univerzális endoglikozidáz. Viszont a Ser/Thr hidroxilcsoportjaihoz kapcsolódó glikozidos kötés lúgra érzékeny, azaz bázikus kezeléssel a különböző O-glikánokat egységesen le tudjuk hasítani.<sup>[19]</sup> A visszamaradó fehérje az erősen bázikus közegben degradálódik. További nehézséget okoz, hogy a béta eliminációval képződő oligoszacharid nem stabil, bázikus közegben a redukáló vég felől egy többlépcsős, spontán, ún. „lehámozódási”

(„peeling”) reakció játszódik le. Ennek minimalizálására többfajta kémiai megoldás született, viszont több-kevesebb veszteséggel mindig számolni kell.<sup>[20]</sup> Reduktív béta elimináció esetén NaOH és NaBH<sub>4</sub> együttes adagolásával a képződő oligoszacharidok *in situ* cukoralkohollá redukálódnak. A nemreduktív béta-elimináció előnye, hogy a lehasadó cukor redukáló vége derivatizálható. Végül az O-glikánokat hidrazinnal is lehasíthatjuk (az N-glikánokhoz képest alacsonyabb hőmérsékleten és gyorsabban), a lehámózódás víz- és sómentes körülmények között visszaszorítható. Itt jegyeznénk meg, hogy a glikánok analízisét gyakran előzi meg derivatizálás.<sup>[21]</sup> Ez igen gyakran bázikus közegben végrehajtott permetilezés a hidroxilcsoportok védelmében. A hidrofobicitás növelése előnyös lehet a kromatográfia és az MS-analízis során is, nemcsak a tömegspektrometriás jelet növeli, hanem a hidroxilcsoportok „blokkolásával” megakadályozza egyes monoszacharid-egységek vándorlását az ütközéses aktiválás során, ami módosítatlan glikánoknál kismértékben ugyan, de előfordul. Szintén gyakori az ún. címkézés (tagging), azaz amikor az oligoszacharid redukáló végére hidrofób, jól ionizálódó, UV-elnyelő vagy fluoreszcens csoport kerül. A „címké” beépítése elsősorban az elválasztásnál, detektálásnál jelent segítséget, és rögtön kvantitatív jelet is biztosíthat. Természetesen ezt a fajta derivatizációt a redukzív hasítás után nem lehet végrehajtani.

Az oligoszacharidok szerkezetét eredetileg komplex kémiai reakciókkal, később NMR segítségével fejtették meg. Manapság az izolált O-glikán-elegyek jellemzésére is tömegspektrometriát használunk leggyakrabban, amit jellemzően valamilyen elválasztási technikával kapcsolunk, hogy a minta komplexitását csökkentsük, és az izomer szerkezeteket egymástól elválasszuk. Legnagyobb felbontóképessége a porózus grafit oszlopoknak (porous graphite chromatography, PGC) van, de használhatunk HILIC-et vagy fordított fázisú kromatográfiát is (lásd 4. fejezet).<sup>[22]</sup> Glikánelegyeket szeparálhatunk elektroforézissel is, amely a kromatográfiánál jóval nagyobb felbontást biztosít, hátránya viszont, hogy nehezebben kapcsolható tömegspektrometriával és kisebb érzékenységet biztosít, ugyanakkor egy feljövőben lévő módszer.

A glikánok tömegspektrometriás jellemzése a redukált natív glikánok esetén negatív ionizációs módban, míg derivatizált cukrok esetén pozitív ionizációs módszerrel történik.<sup>[21]</sup> A cukrok szerkezeti jellemzésére többfajta fragmentációs módszert is használhatunk. Ha redukált natív glikánokat vizsgálunk ioncsapda CID-vel (rezonanciagerjesztés), az aktiválás a glikozidos kötések egyszeres hasadását váltja ki, így a cukor összetételéről kapunk információt, de a kapcsolódási helyek („linkage position”), tehát hogy a monoszacharidok mely hidroxil csoportokon keresztül kapcsolódnak egymáshoz, nem deríthetők ki. Permetilált glikánok esetén viszont már megfigyelhető a cukorgyűrűk fragmentációja is, ami a kapcsolódási helyek meghatározását is lehetővé teszi. Ütközéses aktiváláson kívül gyökös fragmentációt (ETD, ETHcD), ütközési cellában kivitelezett ütközéses aktiválást (QTof, HCD), infravörös multifoton disszociációt is alkalmazhatunk. Általánosan igaz azonban, hogy izomer szerkezetek megkülönböztetéséhez MS<sup>n</sup> (n=3-5) analízisre van szükség, ami komplex elegyek, pl. testfolyadékokból vagy szövetekből izolált limitált mennyiségű minta analízisére nem alkalmas. Az ionmobilitás-tömegspektrometria esetleg megoldás lehet az izomerek elválasztására, de ezt a technikát egyelőre még csak egyszerűbb elegyeken tesztelték. A glikánokról felvett MS/MS adatok értelmezésére számos szoftvert fejlesztettek, de jelenleg ezek még nem képesek az izomer szerkezetek megkülönböztetésére vagy kvantitatív összehasonlításokra.

## Ajánlott irodalom

1. Eichwald E. Beiträge zur Chemie der gewebbildenden Substanzen und ihrer Abkömmlinge. I. Über das Mucin, besonders der Weinbergschnecke. *Annalen der Chemie und Pharmacie*, 1865; 134:177-211.
2. Brockhausen I, Wandall HH, Ten Hagen KG, et al. O-GalNAc Glycans. Chapter 10 in: *Essential of Glycobiology*, 4th Ed, cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022.
3. Riley NM, Bertozzi CR, Pitteri SJ. A Pragmatic Guide to Enrichment Strategies for Mass Spectrometry-Based Glycoproteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2021; 20:100029. doi: 10.1074/mcp.R120.002277.
4. Chang CF, Pan JF, Lin CN et al. Rapid characterization of sugar-binding specificity by insoluble proximity binding with photosensitizers. *Glycobiology* 2011, 21, 895-902.
5. Trinidad JC, Schoepfer R, Burlingame AL et al. N- and O-glycosylation in the murine synaptosome. *Mol. Cell. Proteomics* 2013; 12:3474-88.
6. Tachibana K, Nakamura S, Wang H et al. Elucidation of binding specificity of Jacalin toward O-glycosylated peptides: quantitative analysis by frontal affinity chromatography. *Glycobiology* 2006; 16:46-53.
7. Steentoft C, Vakhrushev SY, Vester-Christensen MB et al. Mining the O-glycoproteome using zinc-finger nuclease-glycoengineered SimpleCell lines. *Nature Methods* 2011; 8:977-82.
8. Klement E, Raffai T, Medzihradsky KF. Immobilized metal affinity chromatography optimized for the analysis of extracellular phosphorylation. *Proteomics* 2016; 16:1858-62.
9. Nilsson J, Rüetschi U, Halim A, et al. Enrichment of glycopeptides for glycan structure and attachment site identification. *Nat. Methods* 2009; 6:809-11.
10. Chu FK. Requirements of cleavage of high mannose oligosaccharides in glycoproteins by peptide N-glycosidase F. *J Biol Chem*. 1986; 261:172-7.
11. Darula Z, Medzihradsky KF. Analysis of Mammalian O-Glycopeptides-We Have Made a Good Start, but There is a Long Way to Go. *Mol Cell Proteomics*, 2018; 17:2-17.
12. Franc V, Yang Y, Heck AJ. Proteoform Profile Mapping of the Human Serum Complement Component C9 Revealing Unexpected New Features of N-, O-, and C-Glycosylation. *Anal Chem*. 2017; 89:3483-91.
13. Halim A, Westerlind U, Pett C, et al. Assignment of saccharide identities through analysis of oxonium ion fragmentation profiles in LC-MS/MS of glycopeptides. *J Proteome Res*. 2014; 13:6024-32.
14. Riley NM, Bertozzi CR. Deciphering O-glycoprotease substrate preferences with O-Pair Search. *Mol Omics*. 2022; doi: 10.1039/d2mo00244b.
15. Baker PR, Trinidad JC, Chalkley RJ. Modification site localization scoring integrated into a search engine. *Mol. Cell. Proteomics* 2011; 10(7):M111.008078.
16. Bern M, Kil YJ, Becker C. Byonic: advanced peptide and protein identification software. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 2012; Chapter 13, Unit13.20.
17. Lu L, Riley NM, Shortreed MR, et al. *Nat Methods*. 2020; 17:1133-8.
18. Tamara S, den Boer MA, Heck AJR. High-Resolution Native Mass Spectrometry. *Chem. Rev*. 2022; 122:7269-326.
19. Zauner G, Kozak RP, Gardner RA, et al. Protein O-glycosylation analysis. *Biol. Chem*. 2012; 393:687-708.
20. Wilkinson H, Saldova R. Current Methods for the Characterization of O-Glycans. *J Proteome Res*. 2020; 19:3890-905.
21. Han L, Costello CE. Mass spectrometry of glycans. *Biochemistry (Mosc)*. 2013; 78(7):710-20.
22. Peng W, Gutierrez Reyes CD, Gautam S, et al. MS-based glycomics and glycoproteomics methods enabling isomeric characterization. *Mass Spectrom. Rev*. 2021; 10.1002/mas.21713.

## 13. LÉZERDESZORPCIÓS TÖMEGSPEKTROMETRIA

Márk László

### Bevezetés

Nagy energiájú impulzuslézer nyalábját egy szilárd felületre fókuszálva olyan lokális teljesítménysűrűség ( $10^6$ – $10^{12}$  W/cm<sup>2</sup>) érhető el, amely elegendő az adott terület pillanatszerű szublimálásához. Ennek megfelelően, a minta molekuláinak gázfázisba juttatása, illetve ionizációja történhet gyors, tipikusan nano- és femtoszekundum impulzushossz-tartományba eső monokromatikus, jól kollimált fénynyalábbal. Az alkalmazott lézer hullámhossza többnyire az UV vagy infravörös tartományba esik, míg frekvenciatartománya 60–2000 Hz közötti, ennek megfelelően igen népszerűek a nitrogén-, Nd:YAG szilárdtest- és mid-IR lézerek.

Tehát az alkalmazott lézer energiája kettős hatású: elvégzi a szilárd minta gázfázisba juttatását (ablációját) és ionizálja a felületen található vegyületeket, azonban nem minden esetben történik meg mindkét folyamat. Vannak ionizációs technikák, amikor a lézer csupán elpárologtatja a mintát és az ionizációt egy másodlagos ionforrás végzi el. Ilyen technika többek között a lézer ablációs elektroporlasztásos ionizáció (LAESI) vagy a mátrix segített lézerdeszorpciós elektroporlasztásos ionizáció (MALDESI).

A **lézerdeszorpciós ionizáció** (LDI) lényege a mintamolekulák lézersugárral történő elpárologtatása és ionizációja, azonban ilyenkor gyakran keletkeznek rövid élettartamú fragmens ionok. Ezen probléma megoldását a 1980-as évek végén kifejlesztett **mátrix segített lézerdeszorpciós ionizáció** (MALDI) jelentette. Ilyenkor a mintamolekulákhoz kis molekulatömegű szerves, kromofór molekulaszervezetet tartalmazó (pl. aromás elektronrendszert tartalmazó csoportot tartalmazó kismolekulák), ún. mátrix anyagot keverünk, amely elnyeli és közvetíti a lézer energiáját a vizsgálandó anyagnak, illetve ionizálja azt, miközben meggátolja a keletkezett ionok fragmentációját. A módszer egyik legkényesebb pontja az optimális mátrix kiválasztása egy adott vizsgálathoz, koncentrációjának, oldószerének és mennyiségének meghatározása. Általában mustársavat (sinapinic acid, SA),  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-fahéjsavat (HCCA, CHCA), 2,5-dihidroxi-benzoesavat (DHB) vagy 9-aminoakridint (9-AA) alkalmazunk, de vannak speciális applikációkhoz optimalizált mátrixok is (pl. fullerén, szén-nanocső, fémvegyületek).

A minta-előkészítés során a mátrix- és a mintaoldat keverékét (0,2–2  $\mu$ l) a mintatartóra szárítjuk úgy, hogy lehetőleg homogén mikrokristályos szilárd elegyet kapjunk. Különleges applikációk (pl. képképzési tömegspektrometria) esetén a mátrix felvitele történhet ködképzéssel, szublimáltatással vagy nanocseppek formájában, így biztosítható az optimális mátrix-minta arány és a kristályok homogenitása egyaránt. A gyors lézerimpulzusok ebből a szilárd felületből párologtatnak el anyagot, és ez az ionizált részecskefelhő, néhány nanoszekundum (tipikusan 80–200 ns) „várakozás” után kerül az analizátorba. A MALDI segítségével kíméletesen, jelentős fragmentáció nélkül és hatékonyan ionizálhatók még nagy tömegű, bomlékony molekulák is (fehérjék, lipidek, szénhidrátok, oligonukleotidok, polimerek) így igen elterjedt ionizációs módszer a biológiai és orvos-biológiai kutatásokban. További előnye az óriási minta-áteresztő képessége, amely napi több ezer mintát is jelenthet, illetve a tömegspektrum egyszerű felépítése, hiszen többnyire egyszerűen, esetleg kétszeresen töltött

ionok jelennek meg rajta. A módszer hátrányai főként a heterogén minta-mátrix kristályszerkezetre vezethetők vissza, így az eredmények kvantitatív következtetések levonására csak korlátozottan használhatók. Alapvető fontosságú a mérések tömegtartományához optimalizált gyakori, akár minden minta mérése előtti tömegkalibráció. A kis molekulatömegű vegyületek mennyiségi vizsgálatának területén a legígéretesebb megoldások a nanorészecskék homogén felületének alkalmazása (nano particle-assisted laser desorption ionization, NALDI) a mintatartó tálcán. Ebben az esetben ugyanis maga a felület segíti a lézer energiájának elnyelését és az ionizációt, és így az eredményeket nem befolyásolja a minta-mátrix arány és kristályszerkezet.

### Előnyök:

- egyszerű minta-előkészítés,
- egyszerű, könnyen értelmezhető spektrum,
- költséghatékony üzemeltetés,
- alacsony karbantartási költség,
- kis mintamennyiség (1-2 mikroliter),
- nagy mintaáteresztő képesség,
- korlátlan ismételhetőség,
- nagy érzékenység,
- képalkotási lehetőségek,
- rosszul oldódó minták, szuszpenziók vizsgálata.

### Hátrányok:

- gyakori kalibrációs igény,
- korlátozott kvantitatív információ,
- erős ionszupresszió,
- változó minőségű MS/MS adatok,
- érzékenység a sótartalomra,
- kis molekulatömegek interferenciája a mátrixszal,
- széles prekursor ion szelekciós ablak.

A MALDI ideális analizátora a repülési idő analizátor (TOF). Ugyanis a lézer ablációs ionizáció során többnyire egyszerűen töltött ionok képződnek, így a nagyobb tömegű vegyületek (pl. fehérjék, polimerek, poliszacharidok) molekula-, illetve kvázimolekula-ionjai csupán TOF analizátorral detektálhatók.

Emellett a repülési idő analizátor alkalmazásával nagy érzékenység érhető el (lásd 5. fejezet), amely reflektoron módon kiegészül a nagy spektrális felbontással is. A MALDI TOF tömegspektrometria által biztosított tömegtartomány miatt célszerűen két detektort alkalmazunk. A kis tömegű ionokat a nagyobb úthosszt és jobb ionfókuszálást biztosító reflektoron detektorban, míg a nagyobb tömegűeket lineáris módban mérjük.

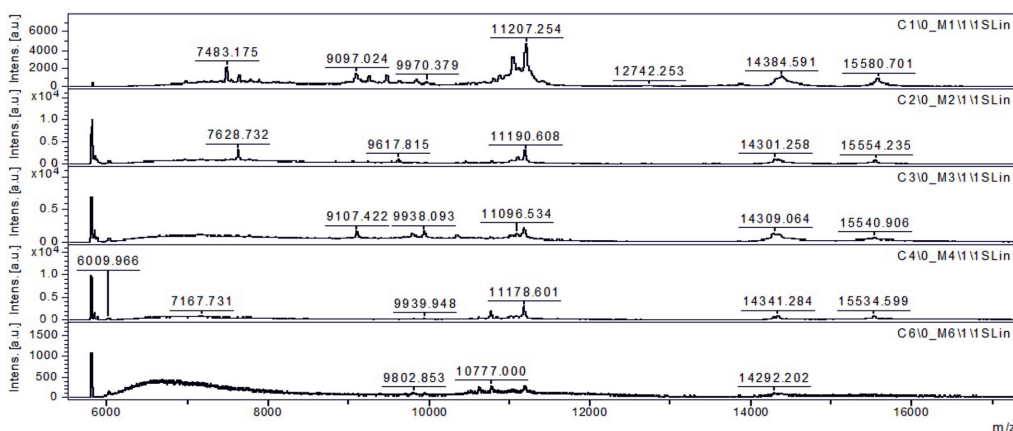
A kimutatási határ rutinszerűen femtomol nagyságrendű, de mivel a minta kristályos állapotban a mintartó tálcán van, így a minták tetszőleges alkalommal és számban újramérhetők, szállíthatók, fagyaszthatók, archiválhatók. Az egyedi lézerimpulzusok által generált spektrumokat önállóan is kiértékelhetjük, vagy akár több ezer spektrumot egyesíthetünk a jobb jel/zaj viszony és a nagyobb érzékenység érdekében.

A reflektoron detektorral rendelkező MALDI készülékek alkalmasak tandem tömegspektrometriás vizsgálatokra közvetlenül az ionforrás után bekövetkező fragmentálással (post source decay, PSD). Ilyenkor a megemelt lézerenergia segítségével bekövetkező unimolekuláris bomlásokból keletkezett fragmens ionokat detektálhatjuk. Bizonyos körül-

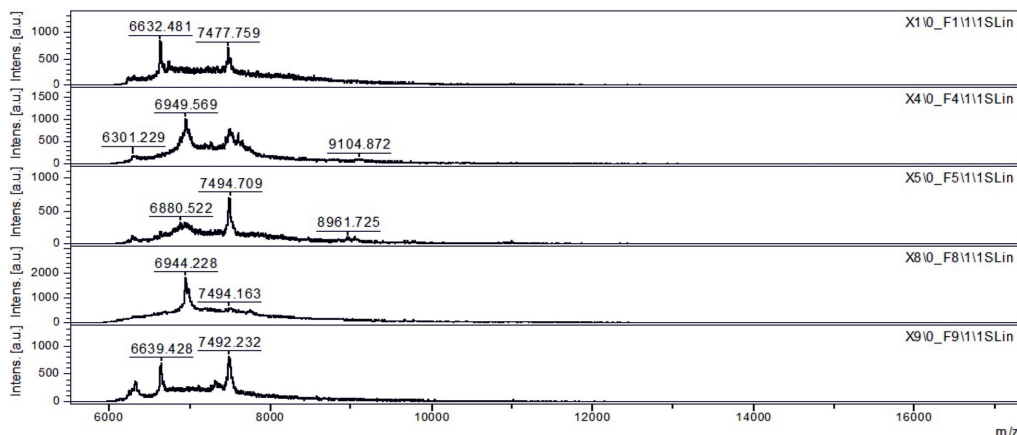
mények között, tiszta, nagy mennyiségű (néhány mikrogramm) fehérjeminta esetében a módszer alkalmas intakt fehérjék terminális szekvenciáinak meghatározására. Néhány típusú MALDI TOF/TOF MS készülékkel megvalósítható a prekursorion-szelekció és -fragmentáció is, melynek során az ionforrásból kilépő részecskéket a PSD mellett argongáz segítségével egy erre a célra kialakított ütközési cellában (collision-induced dissociation, CID) is fragmentálhatjuk.

### MALDI TOF MS a proteomikai vizsgálatokban

Az utóbbi évtizedben a MALDI TOF MS egyre inkább kiszorul a proteomikai applikációkból, hiszen a nano- és mikrokromatográfiával kapcsolt nagy felbontású és tömegpontosságú tandem tömegspektrométerek lényegesen megbízhatóbb, akár kvantitatív eredményeket is szolgáltatnak. Ennek ellenére a MALDI technikák kiválóan alkalmasak nagy áteresztőké-



**13.1. ábra.** Egészséges csoporttól gyűjtött teljes nyálminták reprezentatív MALDI TOF tömegspektrumjai



**13.2. ábra.** Fej-nyaki tumorra diagnosztizált csoporttól gyűjtött teljes nyálminták reprezentatív MALDI TOF tömegspektrumjai

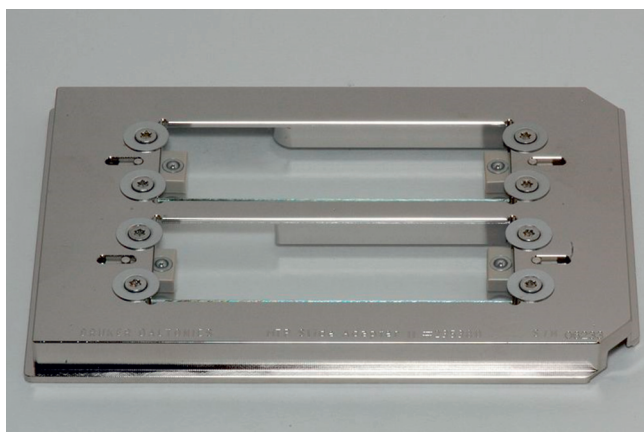


pességű szűrészjellegű, molekuláris ujjlenyomat elemzésre épülő fehérje és peptid analitikai vizsgálatok elvégzésére. Az egyszerű minta-előkészítés és a szükséges minta csekély térfogata (0,5–10 mikroliter) miatt szinte minden fajta mintán gyorsan és könnyen alkalmazható (13.1. és 13.2. ábra).

A lézerablációs készülékek és így a MALDI berendezések is robosztus, nagy mintaszámon, rutinszerűen és megbízhatóan alkalmazható, nem szervízigényes technikák. Ennek és a jó minőségű lézerek árának folyamatos csökkenése miatt a MALDI tömegspektrometria alkalmazása jelent meg elsőként a rutin orvosi diagnosztika területén. Számos próbálkozás volt az LC-MS technikák diagnosztikai laboratóriumi bevezetésére, azonban ezek kevés sikerrel jártak. Ezzel ellentétben napjainkban, a modern mikrobiológiai laboratóriumok ezrével alkalmazzák különböző gyártók, kisméretű (benchtop) MALDI TOF MS készülékeit a kórokozók fajsztintű azonosításában és a mikrobiális fertőzések rutin diagnosztikájában. Ezek a mikrobiológiai felhasználásra optimalizált MALDI készülékek lineáris detektorokkal és tipikusan 50–1000 Hz-es UV lézerükkel egy költséghatékony, de napi rutinban megbízhatóan használható megoldást jelentenek, amelynek segítségével szövetekből, vérből, vizeletből a töredékére csökkent a humán patogén baktériumok, gombák fajsztintű detektálásának ideje és költsége. A vizsgálatok során 96 minta felvitelére alkalmas rozsdamentes acél mintatartó tálcára cseppentve a mintát és a mátrixoldatot, azt beszárítva mérhetünk. Az analízis tipikus vizsgálati ideje a lézer frekvenciája függvényében 30–50 másodperc/minta. A vizsgálatok során a készülék kalibrálásához általában egy baktériumfajból (pl. *E. coli*) készített kivonatot használunk. A gyártók a készülékekhez egyszerűen használható, az egyes felhasználási területekre kifejlesztett (pl. vérminták elemzése, baktériumok vagy gombák vizsgálata) kitéteket forgalmaznak, amelyek segítségével néhány órás betanulás után bárki megfelelő, klinikailag validált eredményeket kaphat. Az eredmények kiértékelése automatikusan a megfelelő fajspecifikus adatbázis segítségével történik, amely tetszőlegesen bővíthető, fejleszthető.

### Képkalkotási tömegspektrometria

Napjaink egyik legizgalmasabb fejlesztése a MALDI TOF tömegspektrometria képkalkotó módszerként történő alkalmazása (MALDI Imaging Mass Spectrometry, MALDI IMS), melynek során egy speciális mintatartóra 10–20 µm-es szövettani metszetet és mátxitot szárítunk (13.3. ábra).

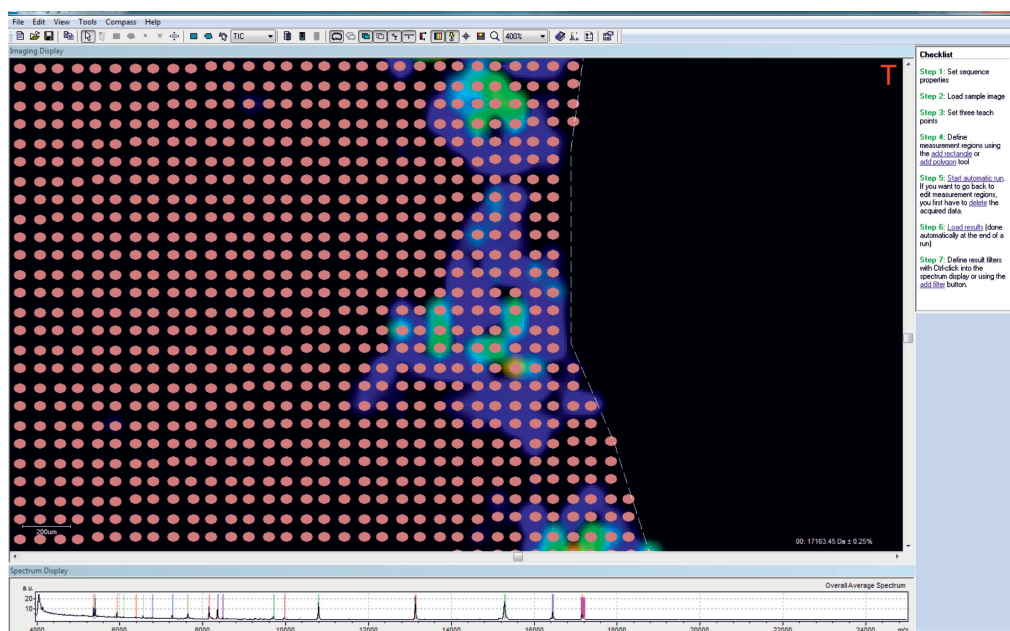


13.3. ábra. Speciális, ún. ITO lemezek befogadására alkalmas MALDI mintatartó

A MALDI tömegspektrometria képalkotási alkalmazása során alapvető fontosságú a mátrixkristályok homogenitása és mérete, ennek megfelelően a mátrix felvitelének technológiája meghatározó jelentőségű. A mátrixoldat készülhet bármilyen általánosan használt mátrixból, a vizsgálandó molekulacsoporttól és az ionizáció polaritásától függően általában CHCA-t, DHB-t vagy 9-AA-t használunk. A mátrixoldatokat frissen, 10–25 mg/ml koncentrációban készülnek, oldószerként 0,1%-os trifluor-ecetsavat és acetonitrilt vagy metanolt alkalmazva. A mátrixoldat felvitele a szövetmetszetre több, akár 50–100 ciklusban történik, amely a homogén mátrixeloszlás mellett biztosítja a vizsgálandó vegyületek felszíni extrakcióját is.

Amennyiben a szöveti fehérjék lokális eloszlásának meghatározása a célunk, akkor a mátrix felvitele előtt lipidmentesíteni kell a szövetmetszetet, hiszen ennek hiányában jelentős ionsuppressziós hatást tapasztalnánk.

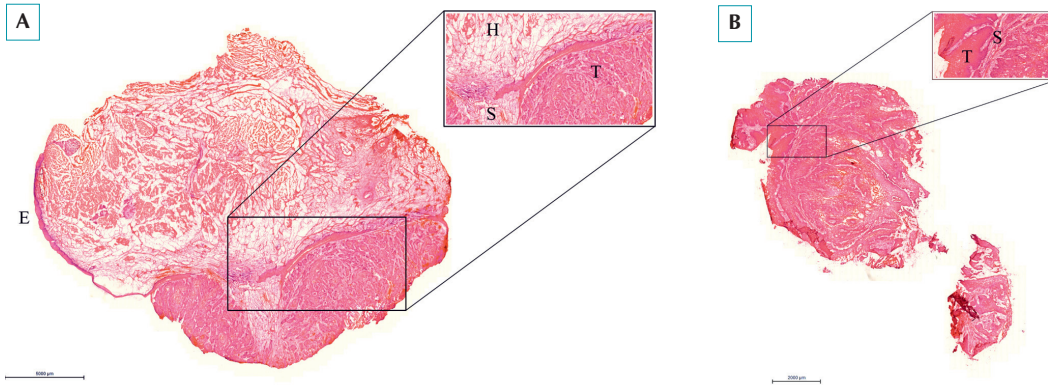
Ezt követően a mintáról előre meghatározott szisztémában és lézerintenzitással több tízezer tömegspektrumot vesszünk fel, és a megfelelő szoftver az egyes  $m/z$  értékekhez tartozó intenzitások eloszlását képként jeleníti meg (13.4. ábra).



13.4. ábra. A szöveti metszet mérési pontjainak kiosztása

A vizsgálatok alkalmasak lipidek, peptidek, fehérjék lokális eloszlásának akár 5–10 mikrométer felbontású feltérképezésére. A térbeli felbontás függ az alkalmazott lézer hullámhosszától, fókuszált méretétől és alakjától, a lézerimpulzusok kiosztásának geometriájától, a vizsgált terület nagyságától és a mátrix felvitelének technológiájától, de tipikusan 50–100 mikrométer. A nagyobb felbontás nagyságrendileg megnöveli a vizsgálat idejét és az összegzett mérési adatok méretét, így az optimális felbontás értékét az adott biológiai, klinikai kérdéshez és mintaszámhoz kell igazítani. Ne feledjük azt sem, hogy egy-egy szövetmetszet mérése során akár 200 000–300 000 lézerlövést is alkalmazhatunk, amely befolyásolja a lézer élettartalmát és az ionforrás tisztításának gyakoriságát.

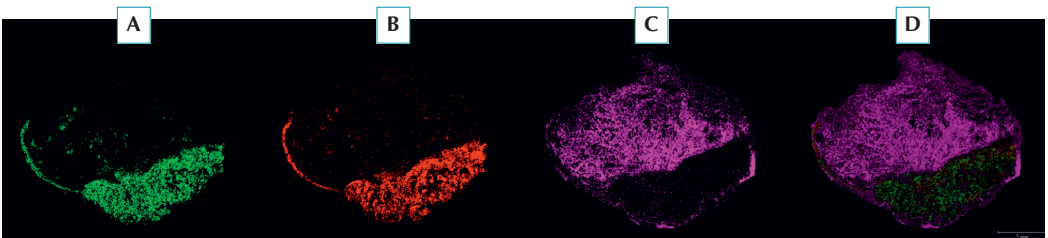
A módszer óriási előnye, hogy párhuzamosan alkalmazható az egyéb (*in vivo* fluoreszcens, NMR, MRI, CT, FT-IR, Raman) képalkotási módszerekkel, így olyan új tudományos és diagnosztikai eredményeket szolgáltat, amelyek forradalmasítják a klinikai diagnosztika mai módszertanát. A MALDI IMS módszer kiváló eredményeket szolgáltat az új patológiai biomarkerek felfedezése során, mivel az egyes vegyületek, vegyületcsoportok lokális eloszlásának vizsgálatával azok közvetlenül köthetők az adott, gyakran nagy heterogenitással rendelkező egészséges vagy patológiás szöveti struktúrákhoz. Például, jól elkülöníthetők és meghatározhatók az egészséges, sztrómális vagy neoplasztikus sejtekben expresszálandó potenciális biomarker molekulák (**13.5. ábra**)



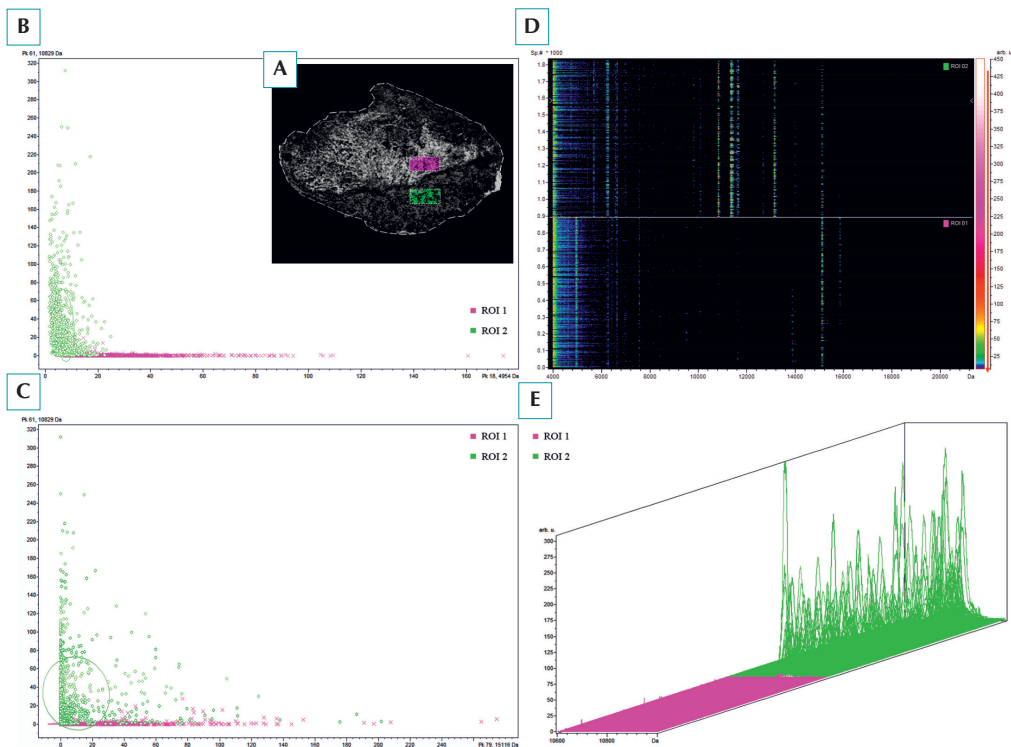
**13.5. ábra.** Fej-nyaki tumorról diagnosztizált páciensek hematoxilin-eozin festett szövettani képe.  
H: egészséges szövet, S: stroma, T: tumor, E: epithelium

A MALDI IMS vizsgálatok eredményei statisztikai szempontból is értékelhetők speciális szoftverek segítségével. Ezek a programok normalizálás után a különböző csoportokba rendezett tömegspektrumokat összehasonlítva meghatározzák azok általános statisztikai és diszkriminációs értékeit. Lehetőség van egyes területekről felvett tömegspektrum-csoportok közvetlen spektrális összehasonlítására is, amely bizonyíthatja az egészséges és patológiás szövetekből kimutatott patológiás jelzőmolekulák prediktív értékét (**13.6., 13.7. ábra**).

A tömegspektrometriás képalkotás óriási előnye, hogy a molekuláris változásokat *in-situ* a szöveti struktúrákkal együttesen tudjuk vizsgálni, azonban a minták összetételének komplexitása miatt az ionsuppressziós hatások is kiemelten jelentkeznek. A mindennapi gyakorlatban a prediktív értékű molekuláris változások kvantitatív meghatározása érdekében az IMS vizsgálatokat célzott immunhisztokémiai elemzésekkel egészítjük ki.



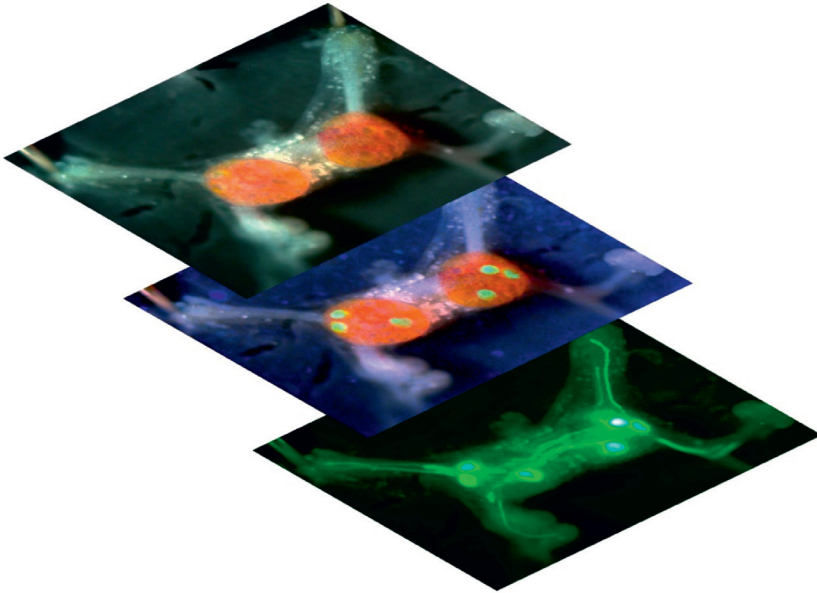
**13.6. ábra.** MALDI TOF képalkotási vizsgálat eredménye. A: S100 A8, B: S100 A9, C: hemoglobin alfa-lánc, D: kompozit kép



**13.7. ábra.** A szövetmetszet két régiójának statisztikai kiértékelésének eredményei.  
Magenta: egészséges régió, zöld: neoplasztikus lézió

A MALDI mellett képalkotásra bármely lézer-deszorpciós technika alkalmazható azonban ezek érzékenysége és térbeli felbontása általában elmarad a hagyományos MALDI IMS technikától. Speciális kiegészítőkkel, pl. optikai szál segítségével történő fókuszálással akár 5 mikrométer alatti térbeli felbontást is elérhetünk, amely fontos információkat szolgáltat a sejtszintű metabolomikai, peptidomikai, lipidomikai és proteomikai kutatásokhoz. Az in-vivo körülmények között is alkalmazható atmoszférikus nyomáson működő módszerek-nél (pl. LAESI) élő sejtek molekuláris változásait pl. neurális hálózatok metabolizmusát, kommunikációját is vizsgálhatjuk.

Speciális fluoreszcens festéket és az adott hullámhosszra optimalizált lézert alkalmazva megvalósítható, hogy a lézerlövés hatására egy fluoreszcensen megjelölt sejt vagy sejtcsoport párologjon el, így ezek molekuláris felépítése akár sejtszinten detektálható legyen. Ezt a technikát könnyen kombinálhatjuk a hagyományos immunhisztokémiai, fluoreszcens mikroszkópiás módszerekkel, amelyek növelik az eredmények orvosi diagnosztikai, klinikai alkalmazásának lehetőségeit (13.8. ábra).



**13.8. ábra.** Nagy mocsári csiga neuronjainak egysejt proteomikai vizsgálata. A zöld szín egy neuropeptid (FMRFa) lokális eloszlását mutatja.

#### Ajánlott irodalom

1. Gross JH. Mass Spectrometry: A Textbook. Springer, Heidelberg, 2004.
2. Lipton MS, Pasa-Tolic L. Mass Spectrometry of Proteins and Peptides. Humana Press, New York, 2009.
3. Talián CsG, Márk L, Melegh B. Tömegspektrometria. In: Debreczeni L, Kovács LG (szerk.). Gyakorlati Laboratóriumi Medicina. Literatura Medicina Kiadó, Budapest, 2008. 477-92.
4. Vékey K, Telekes A, Vértes A. (eds): Medical Applications of Mass Spectrometry. Elsevier, Amsterdam, 2008.

## 14. GÉLELEKTROFORÉZISEN ALAPULÓ TECHNIKÁK

Kékesi Adrienna Katalin

A proteomikai kutatások célkitűzése kétirányú, egyrészt célja lehet, hogy a vizsgált mintában jelen lévő minél több fehérjét ki tudja mutatni, másrészt legalább ennyire fontos a kísérleti alanyok/minták fehérjekészletének összehasonlító vizsgálata. Ez utóbbihoz az egyik gyakran használt, a legutóbbi időkben kifejlesztett metodika a kétdimenziós differenciál-gélelektroforézis (2-D DIGE), melynek részletes bemutatásával foglalkozik jelen fejezet. Mielőtt azonban részletesen bemutatnánk a metodikát, rövid történeti és elméleti ismertetést adunk a hozzá vezető út fontosabb állomásairól.

Az elektroforézis kifejezés görög eredetű, az elektro (áram) és forézis (szállít) szavak összekapcsolásából született. Ha töltéssel rendelkező részecskéket valamilyen hordozón változó elektromos erőter hatásának teszünk ki, azok különböző sebességgel elmozdulnak az adott hordozóban, s ezáltal a részecskék elkülöníthetők lesznek egymástól. Mozgásukat több tényező befolyásolja, így a térerő, a részecske töltéssűrűségéből adódó elektroforetikus mozgékonyasága, a részecske töltése (amely a közeg pH-jától függ), a molekula mérete, s végül a viszkozitás, ami a hordozó sűrűségétől függ.

A metodika gyakorlati alkalmazásáról az első publikációk a múlt század elején jelentek meg, folyadékfázisú hordozón történő elválasztással, Arne Tiselius svéd biokémikus nevéhez köthetően.<sup>[1]</sup> Az azóta eltelt évek alatt az elektroforézis elvén számos nagy felbontóképességű analitikai szeparációs eljárás került kifejlesztésre, melyek különböző biológiai makromolekulák – fehérjék, szénhidrátok, DNS, RNS – elválasztását teszik lehetővé. Jelen fejezetben a fehérjék elválasztására, ezen belül is a gélelektroforézisre koncentrálunk, az azt megelőző, ám korántsem elhanyagolható metodikákkal, mint a zónaelektroforézis vagy a kapilláris elektroforézis, nem foglalkozunk.

Hordozóközegként legegyszerűbbnek valamilyen folyadékfázisú hordozó alkalmazása tűnt, azonban problémát jelentett a diffúzió, valamint a hőmérséklet-különbségek hatására fellépő mikroáramlások jelensége, amelyek az elválasztás hatásfokának romlásával jártak együtt. Ezért a folyadékoknál szilárdabb kolloid hordozóközegre volt szükség, amely csökkenteni tudja vagy kiküszöböli ezeket a problémákat. A megoldást a diffúzibilis részek számára átjárható térhálós gélek alkalmazása jelentette. Használatuk során külön előnyt jelent, hogy fizikai tulajdonságaik széles határok között változhatnak a gél felépítő térháló szerkezetétől és a polimerduzzasztó közeg közötti kölcsönhatástól függően, ezáltal szabályozható molekulaszűrőként is alkalmazhatók. A térhálós gélek egyik legjelentősebb csoportjába azok tartoznak, amelyek váza szerves makromolekulákból, ún. polimerekből épül fel. Biológiai alkalmazásukhoz azonban a gélek anyagával szemben támasztott követelmények miatt – kémiailag inert, hidofil, széles pH- (3–10), ionerő- és hőmérsékleti tartományban stabil, neutrális (tehát töltött csoportokat nem tartalmazó), fizikailag ellenálló, áttetsző, a kimutatásra használt festékekkel nem festődő – csupán két vegyület felelt meg, az agaróz és a poliakrilamid. Felhasználhatóságukat tovább korlátozta eltérő pórusméretük, ezért az agarózt elsősorban a nagyméretű nukleinsavak elválasztására használják, míg a poliakrilamid géleket a fehérjék és peptidok szeparálására.



Az akrilamid vizes oldatban katalizátor és iniciátor jelenlétében polimerizálódik nagy molekulatömegű lineáris polimert létrehozva. Leggyakrabban katalizátorként ammónium-peroxidszulfátot, míg iniciátorként TEMED-et (N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin) alkalmazunk. Ha az oldathoz keresztkötő ágens, N,N'-metilén-biszakrilamidot is adunk, térhálós szerkezetű gél hozhatunk létre, ahol az egyes poliakrilamid-láncokat metilénhidak kötik össze. A gél porozitását, elasztikusságát, áttetszőségét az akrilamidlánc hossza és a térhálósodás mértéke határozza meg, amelyeket az akrilamid és a N,N'-metilén-biszakrilamid koncentrációjával, valamint százalékos arányukkal szabályozhatunk. Az akrilamidkoncentráció széles (4–20%) tartományban alkalmazható, a keresztkötő ágens a monomer 1–3%-a lehet. Ezáltal, ha ismerjük az adott kísérletben elválasztásra váró fehérjéink mérettartományát, akkor annak megfelelő pórusméretű gél tudunk önteni. A gél a fehérjék méretének függvényében befolyásolja a részecskék vándorlásának sebességét, a kisebb méretű részecskék gyorsabban vándorolnak, de a gél pórusméreténél nagyobbak akár el is akadhatnak.

A poliakrilamid gél polimerizációja két, igen gondosan megtisztított üveglap között megy végbe, amelyek egymástól 1–1,5 mm távolságra vannak (a később ismertetendő metodikánál alacsony fluoreszcenciájú üveglapokat kell használnunk). A gélek polimerizációját gátolhatja a molekuláris oxigén, ezért gélingtonás előtt az oldatból a levegőt vízlégszivattyúval vagy ultrahangos készülékkel el kell távolítani. Gélingtonás után közvetlenül az oldat felszínét desztillált vízzel telített n-butanol oldattal le kell fedni, hogy meggátoljuk az O<sub>2</sub> gélbe oldódását, egyben egyenletes felszínt biztosítva a polimerizálódó gélnek. Egyszerre több (akár 6) gél önthetünk.

A kereskedelembe kaphatók különböző összetételű, előre öntött ún. „pre-cast” gélek, azonban ezek ára többszöröse a saját magunk által öntött gélekénél.

### Izoelektromos fókuszálás (IEF)

A fehérjéket felépítő aminosavak mindegyike külön töltést hordoz, és a fehérje teljes töltése az öt felépítő aminosavak egyedi töltéseinek összege. A fehérjék amfoter vegyületek, azaz hidrogénion (proton) leadására és felvételére egyaránt képesek, nettó töltésük az őket körülvevő közeg pH-értékétől függ. Izoelektromos pontnak (pI) nevezzük azt a pH-értéket, ahol nettó töltésük nulla. Az izoelektromos fókuszálásnak nevezett metodika a fehérjék izoelektromos pontjainak különbözőségén alapul. Ha a fehérjéket egy változó pH-tartományú gélmátrixra, elektromos térbe helyezzük, vándorolni kezdenek izoelektromos pontjuk pH-tartománya felé. Töltésük vándorlásuk során pontról pontra változik, ha a közeg pH-értéke alacsonyabb a fehérje izoelektromos pont értékénél, a fehérje pozitív töltésű lesz és a katód felé mozdul el, míg, ha a közeg pH-értéke a magasabb, negatív töltésű lesz és az anód felé vándorol, egészen addig, amíg nettó töltése zéróvá nem válik. Ez a gélmátrixnak azon a helyén következik be, ahol a pH a fehérjemolekula izoelektromos pontjával megegyezik, erről a pontról a molekula már nem mozdul el.

Az elválasztáshoz tehát szükségünk van egy gélmátrixban létrehozott meghatározott tartományon belüli pH-grádiensre. Ezt amfoter elektrolitok (amfolitok) segítségével tudjuk elérni. Az amfolitok olyan kis molekulatömegű (300–500 Da) alifás poliamino-polikarbonsavak keverékéből állnak, melyek izoelektromos pontjai néhány század pH egységben különböznek egymástól. Immobilizált pH-grádiens alkalmazásával ez az érték akár 0,001 pH-egység is lehet. A fehérjéknél leírt módon, töltésüknek megfelelően elvándorolnak az anód, vagy a katód felé, és izoelektromos pontjuknál megállva hozzák létre a pH-grádiens, azaz a grádiens maga az izoelektromos állapotban levő poliamino-polikarbonsavak sorozata, melyek pufferként működve stabilizálják környezetük pH-értékét. Az így létrehozott pH-grá-



diens segítségével tudjuk a fehérjéket rábírní arra, hogy ők is izoelektromos pontjuknak megfelelő helyen megállva fókuszálódjanak. A kereskedelemben kaphatók különböző pH-tartományt lefedő szárított gélcsíkok, amelyek immobilizált pH-grádienseket tartalmaznak, ezek segítségével sokkal reprodukálhatóbban tudjuk elvégezni az elválasztást, mintha magunk hoznánk létre a pH-grádiens amfolitok alkalmazásával. A fókuszálás hatásfokának növelése érdekében az elválasztandó fehérjemintánkhöz is célszerű adni 1–2%-ban amfolitot.

A fókuszálódást, azaz a pH-grádiens feloldóképességét több tényező befolyásolja, a fehérje diffúziós együtthatója, a pH grádiens meredeksége, az alkalmazott feszültség által létrehozott elektromos térerősség, valamint az oldott anyag mozgékonyságának változása a pH-val a pl környezetében. Az elválasztást az elektromos térerősség növelésével, továbbá a pH tartomány szűkítésével tudjuk javítani. A térerősség növelésének azonban gátat szab a fejlődő hő, ennek elvezetéséről gondoskodni kell. Fontos továbbá, hogy a gél védeni kell a kiszáradástól, immobilizált gélcsíkok alkalmazásakor ezt legegyszerűbben a gél paraffinnal történő lefedésével tudjuk elérni. Figyelnünk kell továbbá a minták sótartalmára, mert nagyobb só koncentráció zavarhatja az elválasztást.

## SDS-PAGE

A fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztására leggyakrabban az SDS-PAGE (*nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézis*) metodikát<sup>[2]</sup> használjuk, ahol az elválasztás a fehérjék denaturált, azaz konformációvesztett állapotában történik. A metodika során a Na-dodecilszulfát (SDS) ( $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ ) és a poliakrilamid gél együttes alkalmazása lehetővé teszi a szerkezet és töltés hatásának kiküszöbölését, így a fehérjéket kizárólag molekulatömegük különbsége alapján választjuk el.

A denaturáció több lépésben történik. Először a szolubilizált fehérjéket redukálnunk kell, majd detergenssel kezelni. A diszulfid-hidak hasítása legtöbbször merkaptotanol vagy ditiotreitolt (DTT) segítségével valósul meg. Ezt követően a fehérje-fehérje, illetve a fehérje-lipid kölcsönhatásokat kell megszüntetni. Fehérjék elválasztásához a leggyakoribb detergens az SDS, amely felületaktív anyagként működve elfedi a fehérjék belső töltését, létrehozva egy SDS-fehérje komplexet. Az SDS anionos detergensként alkiláncával a fehérje apoláris felületéhez tapad, a molekula másik oldalán található szulfonsavcsoport további negatív töltést biztosít a fehérjének, egy negatív töltésű burkot képezve. Ez egyenletes töltéseloszlást eredményez egységnyi tömegre vonatkoztatva, biztosítva ezzel a kizárólag molekulatömeg szerinti frakcionálást. A fehérjék teljes denaturációjához 4:1 (w/w) SDS/fehérje koncentráció arány szükséges. 1,4 gramm SDS kötődik egy gramm fehérjéhez, ami két aminosavanként egy SDS-molekulának felel meg. A redukált állapot stabilizálását az -SH csoportok jódcetamidós alkilálásával érhetjük el. Ennek eredményeképpen a fehérjék egy hosszú, pálcikaszerű struktúrát vesznek fel, a „pálcikák” hosszúsága molekulatömegükkel arányos.

## 2-D SDS-PAGE

Mind az izoelektromos fókuszálás, mind az SDS-PAGE önmagában is alkalmas fehérjék szétválasztására, azonban ha olyan komplex (pl. szöveti) biológiai mintát akarunk vizsgálni, amely több ezer fehérjéből áll, akkor ezek hatékonysága nem elégséges. Az 1970-es években születtek az első publikációk, amelyek a két metodikát kombinálták, azaz először az izoelektromos pont alapján történt a fehérjék szeparációja, majd ezt követően molekulatömegük különbözősége alapján választották el őket.<sup>[3,4]</sup>

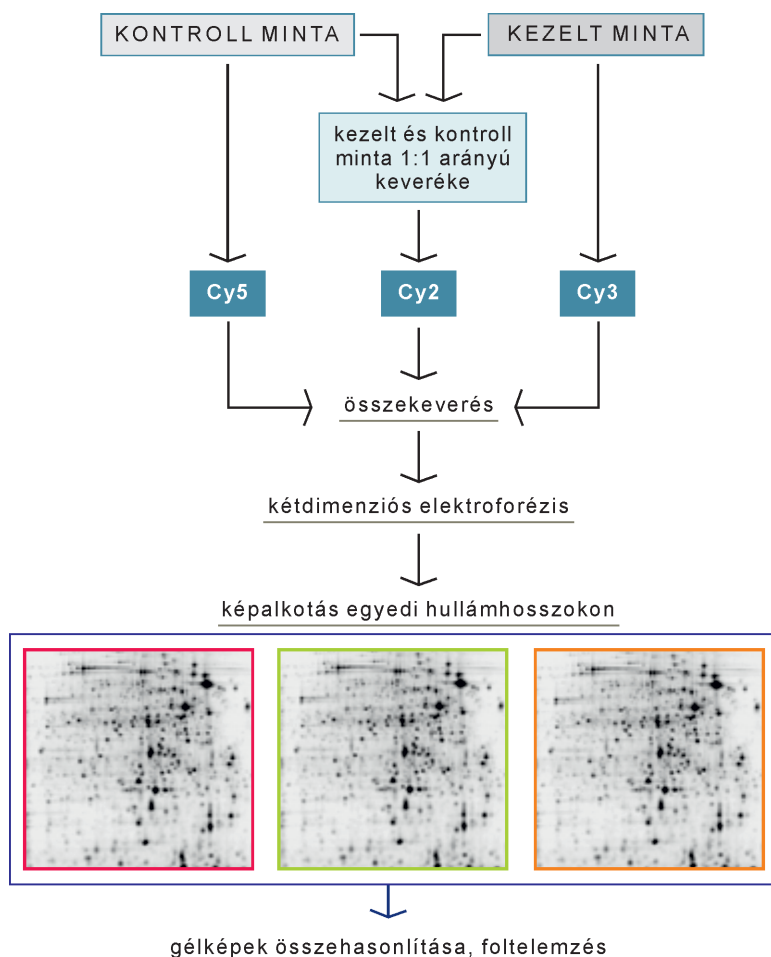
## Kétdimenziós differenciál-gélelektroforézis (2-D DIGE)

A komplex biológiai mintákban nemcsak nagyszámú fehérje egyidejű meghatározása a cél, hanem sokkal inkább annak vizsgálata, hogy melyek azok a fehérjék, amelyek egy adott beavatkozásra (pl. epilepsziás roham kiváltása állatmodellben) koncentrációjuk megváltozásával válaszolnak. De ugyanennyire fontos segítséget nyújt különböző betegségek háttér mechanizmusainak feltárásánál a beteg, illetve egészséges emberekből (kontroll) származó szöveti minták fehérjekészletének összehasonlítása. Bizonyos mértékig a hagyományos (IEF/SDS-PAGE) elektroforézis technikák is lehetőséget nyújtottak erre, de ahhoz, hogy statisztikailag megbízható eredményt kapjunk, nagyon nagy számú (minimum 36) elválasztást kellett végezni, mivel a különböző körülmények között futtatott géleknek nagy volt a variabilitása. Cél volt tehát egy olyan metodika kidolgozása, amellyel csökkenthető a futtatások száma.

Marouga munkatársaival 2005-ben publikálta a kétdimenziós differenciál-gélelektroforézis technikát [two dimensional differential gel electrophoresis (2-D DIGE)], mely lehetővé tette egy adott kísérlet során a futtatások számának drasztikus csökkentését (6-12 gél metodikától függően).<sup>[5]</sup> A módszer több újdonsággal bír. Elsőként azzal, hogy belső standardot használva egy gélen egyszerre több minta fut. Mindezt az tette lehetővé, hogy kifejlesztettek különböző spektrális tulajdonságú fluoreszcens festékeket (CyDye), ezáltal a különböző mintacsoportok jelölése más festékkel történik, és értelemszerűen a fehérjék jelölését nem a szokványos módon elválasztás után, hanem előtte kell elvégezni (14.1. ábra). Annak függvényében, hogy mennyi fehérjét tartalmaz a mintánk, kétféle módszert választhatunk. A Minimal dye-hoz szükséges fehérjemennyiség 20–50 µg/minta, a Full stain festéshez ennek tizede, 2–5 µg/minta is elég. Míg a Minimal dye metodikánál Cy2, Cy3 és Cy5 festék áll rendelkezésünkre, addig a Full stain jelölésnél Cy3 és Cy5. Fontos megjegyezni, hogy a festékek neve azonos a két metodikában, ugyanakkor a jelölés elve, azaz hatásmechanizmusuk különböző. A Minimal dye metodikánál a fluoreszcens festékek NHS észterként vannak aktiválva, így amid kötést tudnak létesíteni a lizin ε-aminocsoportjával. A fluoreszcens festék koncentrációja korlátozza a reakciót, így a fehérjét alkotó lizinek csupán 1–2%-a jelölődik, azaz a 30 perces reakció idő alatt mindössze egyetlen lizin. A Full stain jelölés során a festék a fehérjék redukciója után a cisztein aminosavak SH-csoportjához kötődik, így a fehérjéket első lépésben redukálnunk kell.

Bármelyik metodikát is használjuk, az egyik festékkel mindig a belső standard mintát jelöljük. A belső standard mintát úgy állítjuk össze, hogy az összes, egyszerre vizsgált minta egy adott, azonos fehérjekoncentrációjú hánnyadát tartalmazza, ezáltal minden minta minden fehérjéje reprezentálva van benne. A gélek kiértékelésekor az egyes mintákban lévő egyedi fehérjék mennyiségét az ugyanazon a gélen futó belső standard fehérjék koncentrációihoz tudjuk arányosítani (14.1. ábra). A belső standard használata megnöveli a biztos találatok, s ezáltal az azonosítható fehérjék számát,<sup>[6]</sup> továbbá az ún. technikai párhuzamos mérések száma is jelentősen csökkenthető.

A munkafolyamat tehát a következőképpen zajlik. A szöveti minták feltárása után, a mintákat a jelölés előtt lízis pufferben szuszpendáljuk, majd a pH-jukat az adott metodikának megfelelő értékre állítjuk be (Minimal dye 8,5; Full stain 8,0). Fontos a precíz pH beállítás, mert néhány tized eltérés is rossz minőségű (halvány) jelölést eredményez. Ezután következik a minták fehérjekoncentrációjának meghatározása, majd az azonos fehérjekoncentrációjú minta térfogatok kimérése, illetve a belső standard minta összemérése. Ezt követi a jelölés, melyet a Minimal dye esetében 4 °C-on végzünk. A jelölés leállítása a reakció idő lejártá után a feleslegben adott lizinnel történik. A Full stain jelölésnél mind a redukálást, mind a je-



**14.1. ábra.** A kétdimenziós differenciál-gélelektroforézis jelölési sémája

lölést 37 °C-ra beállított rázógépből végezzük. A belső standardként alkalmazott, a vizsgálandó minták egyenlő arányú összekeverésével nyert mintát mindig azonos festékkel jelöljük (Cy2-vel a Minimal dye és Cy3-mal a Full stain jelölés esetében). Fontos továbbá, hogy a Minimal dye jelölésnél a kontroll, illetve a vizsgálni kívánt mintákat Cy3-mal és Cy5-tel fele-fele arányban jelöljük, hogy elkerüljük a festékekből fakadó esetleges különbségeket. A jelölések után az egy gélen futtatott különböző festékekkel jelölt mintákat elegyítjük és redukálószer, valamint amfoter elektrolitot (1–2%) tartalmazó pufferrel, adott térfogatra kiegészítjük. Készülék típustól függően, egyszerre maximum 6, illetve 12 gél tudunk együtt futtatni.

Az izoelektromos fókuszáláshoz a kereskedelemből kapható szárított gélcsíkokat (strip-eket) használunk, amelyek immobilizált pH-grádienseket tartalmaznak. Mintától függően választhatunk különböző pH tartományú stripeket, széles (3–10) és szűkebb (3,5–4,5, 4–5, 4–7, 5–6, 6–8, 9–11) tartományokban. Továbbá léteznek lineáris és nem-lineáris (NL) pH-grádiens tartalmozó gélcsíkok is, ez utóbbiak elválasztási hatékonysága a gradiens közepén a legjobb, míg a gradiens szélei felé logaritmikusan csökken. Továbbá maguknak a

stripeknek a hossza is különböző (7, 11, 13, 18 és 24 cm). Az izoelektromos fókuszálást végző készülékek úgy vannak kialakítva, hogy bármelyik hosszúságú gélcsíkkal működtethetők. Értelemszerűen, minél hosszabb stripet választunk, annál jobb felbontóképességű elválasztást érhetünk el. A felbontóképességet tovább javíthatjuk széles tartományú pH választásával, ezáltal a proteomról is teljesebb képet kapunk. Továbbá fontos megjegyezni azt is, hogy a komplex biológiai minták fehérjei legnagyobb hányadának izoelektromos pontja a 4–7 közötti pH tartományba esik, emiatt a nem-lineáris gélcsíkok használata is ajánlott. Ezért a leghatékonyabb elválasztás a 24 cm hosszú 3–10 NL strippel érhető el.

A fókuszálás előtt a szárított stripet rehidratálni kell és a mintát fel kell vinni. A mintafelvitel történhet aktívan, alacsony feszültség alkalmazásával, vagy passzívan. Ekkor a szárított minta rehidratálására alkalmazott rehidráló pufferbe keverjük bele a mintát, és egy éjszaka alatt a minta a rehidráló oldat komponenseivel együtt beszívódik a gélbe. A rehidratálás során nagyon fontos, hogy a gél és a minta között ne legyen buborék, mivel a buborék egyenetlenné tenné a rehidratálást, ami később az izoelektromos fókuszálás során gátolná a fehérjék mozgását. Fontos továbbá megvédenünk a mintákat a kiszáradástól, ezt paraffinnal történő lefedéssel oldhatjuk meg. Az egy éjszakán át tartó rehidratálás után következik a fehérjék izoelektromos fókuszálása. Komplex biológiai mintáknál, ahol a korábban említett 24 cm-es strippel dolgozunk, 30–8000 V értékek között történik az elválasztás. Kis feszültségnél (2–3 óra alatt) a sók futnak ki a rendszerből, majd gradiens módban folyamatosan emelhetjük az értéket, végül ún. step üzemmódban magas feszültségérték mellett érhetjük el a fehérjék teljes szeparációját. Célszerű az egyes értékeket/időtartamokat úgy beállítani, hogy a teljes elválasztási idő 24 óra legyen, mert így harmadik nap reggel kezdhethetjük a második dimenziós elválasztást. Az IEF után első lépésként a gélcsíkokat redukálószerrel tartalmazó ún. ekvilibáló oldatba helyezzük, mely SDS-t, ureát, glicerint, Tris-t és festékként brómfenolkéket tartalmaz. Minimal dye jelölés esetében a fehérjeinket a redukciót követően jódcetamiddal alkiláljuk, míg Full stain jelölésnél csak az első lépést végezzük el. Ezután a stripeket az előző nap megöntött gélekre csúsztatjuk és óvatosan, hogy a gél felszíne ne sérüljön, szorosan a gél széléhez illesztjük, majd buborékmentesen 0,5%-os agaróz gél oldattal rögzítjük. Az agaróz megdermedése után a géleket a futatókádba helyezzük, ezt követően feszültséget kapcsolunk a rendszerre. A töltött részecskék elmozdulásához szükséges térerősség-gradienst egy egyenáramú tápegység szolgáltatja. Az 5 kDa-nál kisebb molekulatömegű fehérjék alkotják a pufferfrontot, a pufferek anionos komponenseivel együtt. A pufferfrontot a kis molekulatömegű anionos brómfenolkék festék mintapufferhez történő hozzáadásával tudjuk láthatóvá tenni, melyre kis molekulatömege révén nem hat a gél molekulaszűrő hatása, és töltése miatt gyorsabban vándorol a gélben, mint az elválasztandó fehérjék, így jelzi a futási frontot. Az elválasztást 2–12 W közötti értékeken végezzük, amíg a pufferfront eléri a gél alját.

Fontos megjegyezni, hogy az elektroforézis hatékonyságát a gél koncentrációján kívül nagymértékben befolyásolja az alkalmazott puffer, melynek szerepe a stabil pH biztosítása (reprodukálhatóság), de ezen túlmenően a puffer ionjai végzik az áram vezetését. Ha az optimálisnál nagyobb a pufferkoncentráció, az elválasztandó töltött részecskék mobilitása csökken, túl alacsony koncentrációnál megnő a fehérjeionok szerepe az áram vezetésében, ami együtt jár az elválasztás minőségének romlásával, azaz diszkrét fehérjefoltok helyett diffúz, elkenődött fehérjésávokat kapunk.

Az elektroforézis során hő keletkezik, amelynek elvezetéséről – a pufferek hűtésével – gondoskodni kell; ennek hiányában ugyancsak romlik az elválasztás minősége. Ennek kiküszöbölésére a készülékek legtöbbször beépített hűtőrendszert tartalmaznak.

Az elektroforézis végeztével a géleket nagy felbontású lézer-szkennel segítségével beszkennezzük az adott fluorofórnak megfelelő gerjesztési és emissziós hullámhosszok alkalmazásával. A 2-D DIGE során használt fluorofórok sajátja, hogy a fehérjék kovalens jelölése után nem változtatják meg azok izoelektromos pontját, és tömegüket közel azonos mértékben növeli minden festék, azaz az adott fehérje a használt fluorofór típusától függetlenül ugyanabba a pontba kerül. Mindez azt jelenti, hogy a különböző festékekkel jelölt gélek/fehérjefoltok egymásra vetíthetők és a beszkennezt gélképek megfelelő szoftverek (2-D Differential Analysis Software csomag, Progenesis, Delta2D stb.) segítségével kiértékelhetők. Így az egy gélen futó minták fehérjéket tartalmazó foltjainak intenzitása összehasonlíthatóvá válik. A kvantitatív eredményt a statisztikailag szignifikáns változásokat mutató fehérjefoltokról ( $P < 0,05$ ) független, kétoldali Student-féle  $t$ -próba használatával kapjuk meg.

### Fehérjék azonosítása

A szignifikáns változást mutató foltokból a fehérjék azonosításához preparatív gélly futtatunk, ahol a kiindulási fehérjekoncentráció jóval magasabb és a belső standard mintához hasonlóan, minden minta adott hányadát tartalmazza. A futtatás során ugyanazokkal a paraméterekkel dolgozunk, mint a 2-D DIGE-nál, de ez esetben a fehérjefoltok festése a fehérjék elválasztása után történik meg. Többféle festési eljárást alkalmazhatunk. A kolloidális Coomassie Brilliant Blue G250 (CCB G250) festék kimutathatósági határa kb. 10 ng. A festék savas és alkoholos közegben a fehérjék hidrofób oldalláncaival és  $\text{NH}_3^+$ -csoportokkal lép reakcióba.<sup>[7]</sup> A módszer előnye, hogy olcsó és MS-kompatibilis. Az elválasztás után a fehérjéket a gélben savas közegben fixáljuk a diffúzió megakadályozása céljából. A festés több napig is eltarthat, célszerű a gél alacsony fordulatszámú rázógépen tartani 4 °C-os szobában. A gél vastagsága 1 mm, ezért könnyen sérülhet, szakadozhat, ezt megelőzhetjük azzal, hogy gélöntéskor az egyik üveglapot szilanizáló oldattal bevonjuk, ami a gél az üveglaphoz „ragasztja”. Kolloidális CCB G250 festés helyett végezhetünk ún. ezüst festést is, ennek érzékenysége a legjobb. *Shevchenko munkatársaival* 1996-ban dolgozta ki az MS kompatibilis eljárást<sup>[8]</sup> az ezüstoffestésre. A festés itt is savas közegben történik, az ezüstionok a fehérjék töltéssel rendelkező oldalláncaihoz kapcsolódnak és formaldehiddel redukálhatóak. Ha érzékenyebb kimutatást szeretnénk elérni, használhatunk fluoreszcens festékeket. A SYPRO Ruby kimutathatósági határa kb. 1 ng, megfesti a glikoproteineket, lipoproteineket, kalciumkötő fehérjéket, fibrilláris fehérjéket és más nehezen festhető fehérjéket is. Előnye, hogy nem zavarja a fehérjék későbbi tömegspektrometriás elemzését. Ha az előbbieknél is nagyobb érzékenységre van szükségünk, választhatjuk a Flamingo Fluorescent Protein Gel Stain-t, melynek alsó kimutatható határa 0,25–0,5 ng. A festék oldatban nem fluoreszkáló, csak fehérjéhez kötődve válik azzá. A festési eljárás egy egyszerű, kétlépéses protokoll, szemben a fent leírt Coomassie-s festéssel, akár 5 óra alatt is elvégezhető. A megfestett gél (fehérjefolt) akár 8 órán keresztül is ki lehet téve szobai fénynek anélkül, hogy ez befolyásolná a festett fehérjesávok vagy foltok fluoreszcencia intenzitását. A festett gélek sötétben, 2–8 °C-on 6 hónapig tárolhatók a képkészítési érzékenység jelentős csökkenése nélkül. A megfestett fehérjék MS-kompatibilisek.

Miután a fehérjefoltok vizuálisan láthatóvá váltak, a meghatározni kívánt fehérjefoltokat a gélből kivágjuk, és 0,5–1%-os ecetsavban tároljuk. A gél darabkákat 4 °C-on hosszú ideig eltarthatók. A fehérjefoltok kivágásakor különösen figyelni kell a szennyeződések elkerülésére, mivel a humánkeratin-szennyeződés elfedheti a meghatározni kívánt fehérje jelét a tömegspektrometriás mérés során. Ajánlott a teljes folyamatot köpenyben, gumikesztyűben,

maszkban, védőszemüvegben végezni és a kivágáshoz levágott végű steril pipettahegyeket használni.

A fehérjék azonosítása a triptikus emésztési fragmensek tömegspektrometriás mérési eredményeinek bioinformatikai feldolgozásával történik (lásd 7. fejezet).

### Előnyök-hátrányok

A 2-D SDS-PAGE technika alkalmazásával egy 24×20 cm-es standard méretnek tekinthető gélben több ezer fehérjefoltot is el tudunk különíteni. Ugyanakkor egy-egy fehérjefolt a legritkább esetben tartalmaz csupán egyféle fehérjét. A tömegspektrométerek fejlődésével, a kimutathatósági határok javulásával párhuzamosan azt tapasztaljuk, hogy egy kis, kb. 1 mm átmérőjű géldarabkában is akár 5–10 fehérje azonosítható/mutatható ki. Mit jelent ez? Egyrészt azt, hogy nem tudunk minden szignifikáns változást mutató fehérjét megtalálni, mert lehet, hogy az egy foltban futó fehérjék egyikének koncentrációja növekszik, míg a másiké csökken, de ezek a változások nem detektálhatók, hiszen „kioltják” egymást. Másrészt nem tudjuk megmondani 100%-os biztonsággal, hogy a foltban azonosított fehérjék közül melyik, vagy melyikek okozták a változást. Indikációnk lehet, mert legtöbbször a fehérjék az adott foltban nagyon eltérő koncentrációban vannak jelen, így az MS azonosítás során a több peptiddel megtalált fehérje nagyobb valószínűséggel bír a detektált változás létrehozásában. De ahhoz, hogy biztosak legyünk benne, további validálásra van szükség. Felmerül a kérdés hogyan tudnánk megbízhatóbb eredményeket kapni. Ennek egyik módja a minél homogénebb minták előállítása. Vagyis szöveti minták helyett azonos sejtminták vizsgálata, de még relevánsabb adatokat kapunk a szubcelluláris frakciók (pl. szinaptoszóma, szinaptikus vezikula, mitokondrium, mitokondrium asszociált membrán) vizsgálatával. Az irodalomban számos metodikát találunk ezek létrehozására.<sup>[9-14]</sup>

A proteomika egyre erősödő ága a fehérjék biológiai processzálásának, azaz poszt-transzlációs módosításainak (PTM) feltérképezése. A fehérje poszttranszlációs módosításai a leggyakoribb és leghatékonyabb mechanizmusok, amelyek a fehérjefunkció dinamikus szabályozásának hátterében állnak mind az egyedi molekulák, mind hálózatok szintjén.<sup>[15]</sup> A fehérjék a transzláció után különböző módosításokon mehetnek keresztül (folding, darabolás), megváltoztatva ezáltal működésüket, elhelyezkedésüket, de akár a többi molekulával kialakított kapcsolatukat is. Bár a PTM-ek kimutatására a legalkalmasabb módszer a folyadékalapú tömegspektrometriás analízis, a két-dimenziós gélalapú elektroforézissel is ki tudjuk mutatni őket. Ennek háttere, hogy bizonyos módosítások megváltoztatják a fehérjék olyan tulajdonságait, amelyek az elválasztásukban szerepet játszanak, mint pl. a foszforiláció az izoelektromos pontot, ami az első dimenziós elválasztás alapfeltétele, így az egy fehérjén történő foszforilációs változások a gélben látványosan „egy vonatban futnak”. A foszfo-, illetve glikoproteinek jelöléséhez a ProQ Diamond, illetve a ProQ Emerald festékeket használhatjuk.

A proteomikai eredmények megbízhatóságának egyik legfontosabb feltétele a releváns biológiai minta. A fehérjék *in vivo* koncentrációja a fehérjeszintézis, illetve a fehérjék lebontásának sebessége által szabályozott egyensúlyi folyamat eredménye. Mindkét folyamat fehérje-specifikus, ezért nehéz egy általános időablakot kijelölni a mintavételre. Mindez azt is jelenti, hogy a mintavétel időpontjának függvényében más és más eredményre juthatunk, vagyis a proteomikai eredményünk a mintavétel időpontjának aktuális állapotát jellemzi csupán. A publikációknál az új eredmények bemutatása a követelmény, a proteomikai kísérletek eredményeinél akkor lehetünk biztosak azok megbízhatóságában, ha bizonyos százalékból találunk átfedő, változást mutató fehérjéket korábban hasonló témában megjelent publi-



kációkkal. Azaz egy adott kísérleten belül (pl. epilepszia tanulmányozása) minél több publikációban kimutatták egy adott fehérje adott irányú szignifikáns változását, annál biztosabbak lehetünk az adott fehérje szerepében.

Az eredmény minőségét nagymértékben befolyásolhatja a minták kivételének módja, annak gyorsasága, precizitása, ezáltal a minták homogenitása. Humán minták kísérleti felhasználása szigorú szabályok alapján történhet csak, a szabályozás országonként változó. Engedélyek birtokában a műtéti úton eltávolított minták esetében friss szöveti mintákhoz juthatunk, azonban legtöbb esetben csak *post mortem* minta áll rendelkezésünkre. Különösen igaz ez a központi idegrendszer érintő betegségek vizsgálatánál. A halál beállta után eltelt idő, amikor a minta kivétele elkezdődhet a holttestből, a legenyhébb szabály szerint is minimum 2 óra, de vannak országok, ahol 10–24 óra a megengedett idő. Mindez azt jelenti, hogy a fehérjék proteolitikus bomlása nem kivédhető, így humán mintákból megbízható eredményt csak akkor kaphatunk, ha azonos *post mortem* idejű minták állnak rendelkezésünkre, mind a beteg, mind a kontroll oldalról. További nehézség, hogy a kontroll és beteg mintának azonos nemű és legalább közel azonos életkorú személyektől kell származniuk, amit megnehezít a humán minták relatíve alacsony száma. A mintákat szövetminta bankokban  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on,  $\text{N}_2$  atmoszférában tárolják, az agyszövetet struktúráként elkülönítve. A humán testfolyadékok vizsgálata, mint a könny, nyál, vérérum, vérplazma, könnyebben engedélyeztethető, míg liquor mintákhoz nehezebb kísérleti engedélyt kapni.

A kísérleti állatokból történő mintavétel homogénebb mintákat eredményezhet, azonos nemű, azonos korú (akár ugyanabból az alomból származó) állatokon dolgozhatunk, a minták kivétele (disszekció, lézer mikrodisszekció) is könnyen reprodukálható. Állati minták esetén a szervkivétel maximum 1–2 perccel a halál beállta után történik és a minták azonnal szárazjeges hűtésre kerülnek, továbbá a proteolízist gátolni tudjuk enziminhibitorok azonnali hozzáadásával. Ugyanakkor elmondható, hogy nem áll rendelkezésünkre minden humán betegség megfelelő állatkísérleti modellje, mely az emberi betegség tünetegyüttesét reprodukálja. Vagyis az állatmodellek az esetek igen jelentős részében csak közelítőek, és nem adnak azonos információt a humán mintákból nyerhetőkkal. A proteomikai kísérletek legtöbbet használt állatmodelljei a patkányok és az egerek, s kérdés, hogy a belőlük származó adatok mennyire transzlálhatók emberre.

Végül meg kell említeni a metodika hátrányaként, hogy a hidrofób régiókat tartalmazó fehérjék (pl. a membránproteinek), ezzel a metodikával nehezen vizsgálhatók. Ennek oka, hogy az izoelektromos fókuszálást megelőző delipidálást követően ezek a fehérjék kevésbé oldhatók vissza, továbbá a fókuszálás alatt kicsapódhatnak, így nem jutnak át az SDS-poliakrilamid gélekbe. Ahogy korábban is írtuk jelen metodikával a fehérjefoltok, s ezáltal a bennük található fehérjék koncentrációjának változását tudjuk detektálni, és szükséges a fehérjék tömegspektrometriás azonosítása.

### Ajánlott irodalom

1. Tiselius A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans Faraday Soc*, 1937; 33:524-1933.
2. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227:680-5.
3. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. *Humangenetik*, 1975; 26:231-43.
4. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975; 250:4007-21.
5. Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem*, 2005; 382:669-78.



6. Friedman DB, Hill S, Keller JW, et al. Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2004; 4:793-811.
7. Neuhoff V, Stamm R, Eibl H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis*, 1985; 6:427-48.
8. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996; 68:850-8.
9. Annunziata I, Weesner JA, d'Azzo A. Isolation of mitochondria-associated ER membranes (MAMs), synaptic MAMs, and glycosphingolipid enriched microdomains (GEMs) from brain tissues and neuronal cells. *Methods Mol Biol.* 2021; 2277:357-70.
10. Ganzella M, Ninov M, Riedel D, et al. Isolation of synaptic vesicles from mammalian brain. *Methods Mol Biol*, 2022; 2417:131-145.
11. Gulyácssy P, Puska G, Györfi BA, et al. Proteomic comparison of different synaptosome preparation procedures. *Amino Acids*, 2020; 52:1529-1543.
12. Schreiner B, Ankarcrona M. Isolation of mitochondria-associated membranes (MAM) from mouse brain tissue. *Methods Mol Biol*, 2017; 1567:53-68.
13. Völgyi K, Gulyácssy P, Háden K, et al. Synaptic mitochondria: a brain mitochondria cluster with a specific proteome. *J Proteomics*, 2015; 120:142-57.
14. Völgyi K, Badics K, Sialana FJ, et al. Early presymptomatic changes in the proteome of mitochondria-associated membrane in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 2018; 55:7839-57.
15. Karve TM, Cheema AK. Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease. *J Amino Acids*, 2011; 2011:207691.

## 15. IONMOBILITÁS- TÖMEGSPEKTROMETRIA

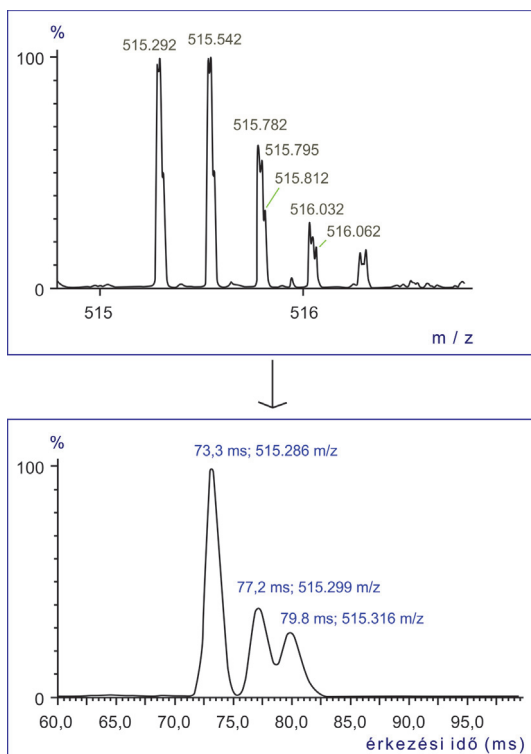
Schlosser Gitta

### Bevezetés az ionmobilitás-spektrometriába

A biológiai minták proteomikai elemzése hatalmas mennyiségű molekuláris információ kinyerését jelenti, amelynek a lehető leghatékonyabb végrehajtásához a technikai, műszeres háttér folyamatosan fejlődik. Minél jobb a tömegspektrométer érzékenysége, minél kifinomultabb a kromatográfiás elválasztás, annál több peptid és ezáltal annál több fehérje lesz azonosítható a mintából. Mind a tömegspektrométerek, mind pedig a folyadékkromatográfok terén folyamatos a fejlődés. A detektálható peptidek száma növelhető például a komplex összetételű fehérjeminták, fehérje-emésztmények előzetes frakcionálásával vagy kétdimenziós kromatográfiás elválasztás tömegspektrométerhez csatolásával. Az utóbbi néhány évben alternatív elválasztástechnikai módszerként egyre inkább elterjedt az ionmobilitás-tömegspektrometria (IM-MS). Az ionmobilitás-spektrometria (IMS) alapjai több mint száz évre nyúlnak vissza: Zeleny 1898-ban írta le azt a megfigyelését, amely szerint különböző ionok eltérő sebességgel haladnak gázokban és a sebességük az ionok méretétől és a töltésétől függ.<sup>[1]</sup>

Az ionmobilitás-spektrometria egy tömegspektrométerbe integrálható, gázfázisú elválasztástechnikai módszer.<sup>[2]</sup> Az elválasztás során a tömegspektrométer ionforrásában keletkező ionokat inert gáz (ún. puffer gáz) jelenlétében elektromos térrel gyorsítják a tömegspektrométer analizátora felé. Gáz jelenlétében az ionok lágy ütközések sorozatát szenvedik el, amely befolyásolja a mozgásukat (elektroforetikus mobilitásukat). A mobilitás sok fizikai paramétertől függ, de egy adott rendszerben az ionok mérete, alakja, tömege és töltésszáma határozza meg. A mobilitás szerinti elválasztás tehát a tömegspektrométer  $m/z$  szerinti elválasztásához képest egy másik dimenziót, alternatív szelektivitást jelent – egy mérésen belül! Az elemzés során a méret, mint az ion jellemző fizikai paramétere önmagában is hasznosítható információ. A gázfázisú pörgő-forgó iont átlagosan gömbszerűnek feltételezve ugyanis meghatározható annak ütközési hatáskeresztmetszete (collision cross section, CCS), amelyet négyzetangströmben fejezünk ki ( $\text{\AA}^2$ ). Egyes modern berendezések felbontóképessége lehetővé teszi minimális szerkezetbeli eltérések kimutatását is, ami nagy előny, ha komplex mintákat vizsgálunk.

Jelen fejezetben az ionmobilitás-elválasztást a proteomikai alkalmazások szemszögéből mutatom be, de fontos megjegyezni, hogy az ionmobilitás-tömegspektrométerek széles körben alkalmazható berendezések és hasznosak minden olyan esetben, amikor komplex mintákat elemeznek (lipidomika, metabolomika) vagy amikor a cél szerkezeti eltérések kimutatása (izomerek, konformerek). Minden olyan különbség, ami a gázfázisú ionok alakját, méretét befolyásolja, lehetőséget ad arra, hogy az eltérő szerkezetű molekulákat megkülönböztessük elválasztani és azonosítani ionmobilitás-tömegspektrometriával. A módszer univerzálisan alkalmazható akár kismolekulák esetén, például izomer szerkezetű, vagy közel azonos molekulatömegű molekulák vizsgálatában, peptidek, oligonukleotidok, oligoszacharidok analízisében, vagy akár makromolekulák, fehérjék szerkezeti változásainak kimutatásában (15.1. ábra).

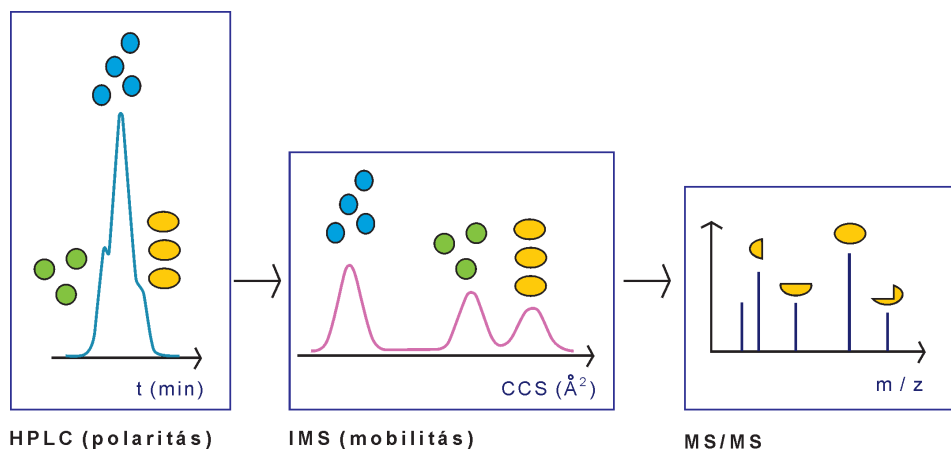


**15.1. ábra.** Példa ionmobilitás-elválasztásra. Fent a tömegspektrum: egy polialanin minta nagyfelbontású tömegspektrumának kis részlete, amely egy négy töltéssel rendelkező ionpopuláció izotópeloszlását mutatja. Az izotópcsúcsok inhomogenitása több átfedő komponens jelenlétére utal. Lent a mobilogram: az ionpopuláció mobilitás szerinti elválasztása három komponens jelenlétét bizonyítja, amelyek pontos molekulatömege így külön-külön meghatározható (alkalmazott műszer: ciklikus ionmobilitás-tömegspektrométer).

Az ionmobilitás-tömegspektrométerekben tehát az ionok térben vagy időben a mobilitásuk szerint választhatók el, ezután történik meg a tömegspektrumok felvétele. Egy meghatározott elektromos térben a kisebb, kompakt ionok mobilitása nagyobb, ezek gyorsabban képesek haladni a puffergázban, mint a nagyobb kiterjedésű, kevésbé mobilis ionok. A CCS adatok bizonyos esetekben közvetlenül meghatározhatóak a mérésből, más esetekben az  $m/z$  skála kalibrációjához hasonlóan megfelelő referenciaionokra kalibráljuk az ionmobilitási skálát (az érkezési időt) is. A műszer kialakításától függően az ionmobilitás alapú elválasztást gyakran MS/MS fragmentálással is kombinálhatjuk, ez a proteomikai alkalmazásoknál szükséges is. Az ionmobilitás-spektrometriát a proteomikában leginkább az LC-MS alapú, shotgun mérésekhez alkalmazzák, ahol egy további elválasztástechnikai dimenzióként növeli az azonosítható fehérjék számát, a mennyiségi meghatározások pontosságát, a dinamikus tartományt és javítja a jel/zaj viszonyt (15.2. ábra).

### Az ionmobilitás-tömegspektrométerek típusai

Sokféle ionmobilitás-tömegspektrométer létezik, amelyek működési elve is eltérő annak függvényében, hogy milyen alkalmazási területekre fejlesztették ki. Az alapkoncepciónak a *driftcsöves ionmobilitás-spektrometriát* tekinthetjük (*drift tube ion mobility*



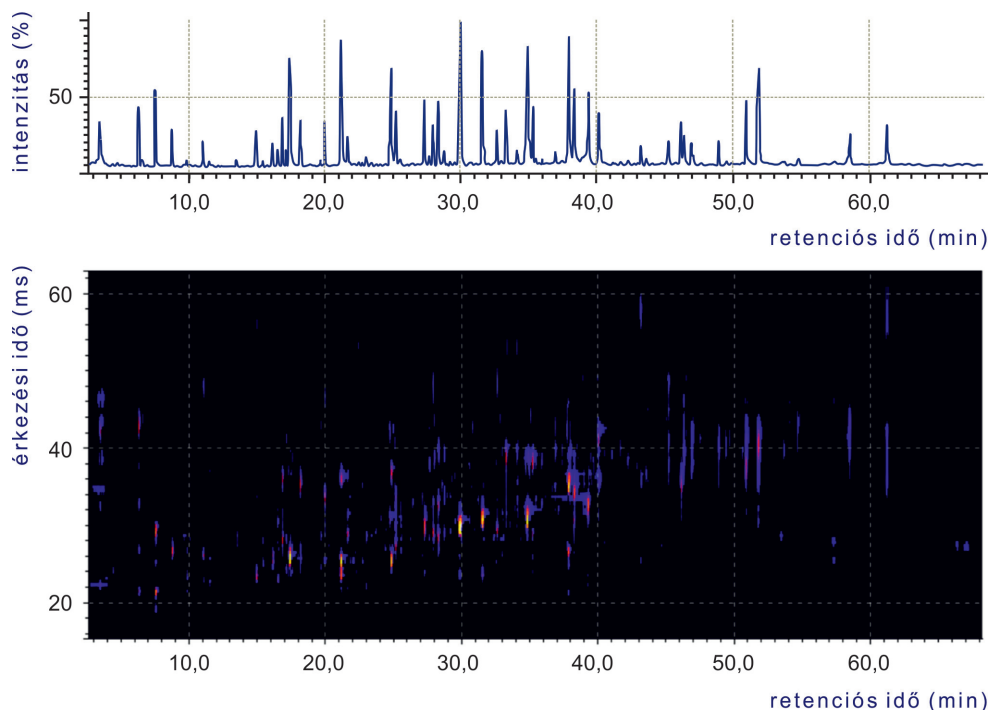
**15.2. ábra.** Az LC-IMS-MS/MS elemzés egyszerűsített lépései

spectrometry, DTIMS), amelyben az ionokat egy gázzal töltött cellán, meghatározott, homogén elektromos térrel sodorják át, adott nyomáson. A cellába az ionokat ioncsomagok formájában juttatják be, majd a mobilitásuk szerint elválasztott ionokat detektálják. A proteomikai gyakorlatban leginkább három teljesen különböző IMS megoldást alkalmaznak, ezeket tekintem át részletesebben. A legelterjedtebb *hibrid LC-IMS-MS/MS berendezések* kvadrupól-TOF analizátor-kombinációra épülnek, amelyben az ionmobilitás-cella a tömegszelektálásra használt kvadrupól és a nagy felbontású TOF analizátor között helyezkedik el. Az IMS-cella gyűrű alakú lemezek sorozatából áll, amelyben az ionok előrehaladása feszültség hullámok segítségével történik (*traveling wave ion mobility, TWIMS*). Puffergázként nagy tisztaságú nitrogén alkalmazható. A cellába belépő ionokat a feszültség hullámok sorozata sodorja a TOF irányába. A peptidek fragmentációjára leggyakrabban ütközésindukált disszociációt (CID) alkalmaznak, amelyre lehetőség van az IMS cella előtt és után is. Ily módon tetszés szerint történhet meg a prekursor ionok vagy a fragmens ionok IMS elválasztása. A proteomikai gyakorlatban a prekursor ionok IMS elválasztása jellemző, adatfüggetlen analízis mellett. A TWIMS tömegspektrométerek egy speciális esete, amikor az IMS-cella gyűrű alakú (ciklikus ionmobilitás-tömegspektrométer, cIM-MS).<sup>[3]</sup> Az így kialakított közel egy méter hosszú, önmagába körbe zárt gyűrűben az ionokat nemcsak egy körben, de akár egymás után több körben elválasztva is elemezni lehet. A többkörös elválasztás előnye a nagyobb úthosszból fakadó nagyobb ionmobilitás-felbontás, amelyet elsősorban tömegszelektált ionpopulációk vizsgálatára alkalmaznak, speciális esetekben.

A TWIMS előnye, hogy a mobilitási adatok felhasználásával megbízhatóbbak a peptid-azonosítások, alacsonyabb lesz a téves pozitív adatok száma. Ilyen műszerekkel a proteomikai mérések során adatfüggetlen (DIA) MS/MS adatgyűjtést alkalmaznak. Bár ilyenkor nagyszámú peptid együtt fragmentálódik, a prekursor ionok és a belőlük származó fragmens ionok az IMS érkezési idő alapján csoportosíthatóak, amely jelentősen növeli az azonosított fehérjék számát a hagyományos DIA méréshez képest.<sup>[4]</sup>

Proteomikai elemzésekhez elterjedten használják a *csapdázásos ionmobilitás-spektrometriát* (*trapped ion mobility spectrometry, TIMS*), amely szintén Q-TOF tömegspektrométerbe integrálva érhető el. A TIMS esetén az ionmobilitás-cella egy szegmentált lineáris ioncsapda és az elválasztás elve pont a fordítottja a TWIMS-nek: az ionokat a csapdában elektromos térrel visszatartják, miközben a velük azonos irányban beáramló gáz előre hajtja

őket. A nagyobb méretű ionok a gázmolekulákkal való ütközések révén gyorsabban előre sodródnak, mint a kompaktabb ionok. A kisebb CCS értékű ionok így lemaradnak a nagyobbakhoz képest. A potenciálkülönbség időbeli csökkentésével az ionok csökkenő méretük szerint elválhatnak a cellából. A TIMS cella közvetlenül az ionforrás után helyezkedik el, így az elválasztott prekursor ionokat a következő lépésben szintén fragmentálni lehet. Az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a TIMS alkalmazása jelentősen csökkenti a koeluálódó peptidok számát, így a mérés tisztább, jobb minőségű MS/MS spektrumokat és megbízhatóbb azonosításokat eredményez, még akkor is, ha a kromatográfiás elválasztás rövid idejű (15.3. ábra).<sup>[5-7]</sup>



**15.3. ábra.** LC-IMS-MS peptidtérkép adatok megjelenítése hőtésképen.

Felső ábra: LC-MS kromatogram; alsó ábra: IMS érkezési idők a retenciós idő függvényében (alkalmazott műszer: ciklikus ionmobilitás tömegspektrométer).

Mind a TWIMS, mind pedig a TIMS előnye, hogy az IMS elválasztáshoz szükséges idő csupán néhány tíz milliszekundum, amely tökéletes összhangban van a kromatográfiás elúciós időkkal és a TOF spektrumfelvételhez szükséges idővel. Mindkét esetben lehetőség van továbbá a CCS adatok kísérleti meghatározására, kalibráció után.

A harmadik elterjedten használt, mobilitásalapú elválasztást kihasználó megoldás a FAIMS (*field asymmetric-waveform ion mobility spectrometry*). Ez a légköri nyomáson működő technika a gázfázisú ionokat aszerint választja szét, hogyan viselkednek egy változó elektromos térben. Proteomikai mérések során az eszközt a tömegspektrométer belépőrése elé pozícionálják, és alkalmazásának fő előnye, hogy segítségével a kémiai zaj jelentős része eltávolítható. A gázfázisú ionok a tömegspektrométer belépőrése előtt egy gázfüggönyön haladnak keresztül, amelynek áramlási iránya merőleges a létrehozott elektromos mező

irányára. Az elektromos teret aszimmetrikus hullámként generálják, amely az egyik pólus felől nagyobb feszültséget jelent, mint a másik pólusnál. A potenciálhullám alacsony szakaszának magnitúdója fele akkora, hossza pedig kétszer akkora, mint a potenciálhullám nagy feszültségű szakasza (ezáltal a negatív és a pozitív polaritású terület összességében véve azonosnak adódik). Az oszcilláló polaritás miatt az ionok mozgása megváltozhat. Amennyiben egy ion mobilitása nem változik az aszimmetrikus elektromos tér hatására, akkor továbbjut a tömegspektrométer felé. Amennyiben egy ion mobilitása az egyik vagy a másik mezőben nagyobb, összességében véve elmozdul az egyik elektród felé. Az ion az elektródig is eljuthat, és ez esetben semlegesítődik, nem detektálható. Egy ion mobilitása megnőhet a magas potenciáltérben, amennyiben csökken az ütközési hatáskeresztmetszete, például azáltal, hogy az adduktjait közben elveszíti. Csökkenhet viszont a mobilitása például egy peptidnek, amennyiben a haladása során változik a konformációja, és ütközési hatáskeresztmetszete ezáltal nagyobb lesz. Annak érdekében, hogy a mérés szempontjából fontos ionok a tömegspektrométerbe jussanak, az aszimmetrikus váltófeszültséget egy kis értékű egyenfeszültséggel kompenzálják, amely a tömegspektrométerbe tereli az eltérülő ionok kiválasztott populációját. A FAIMS tehát egy folyamatos üzemben működő elválasztástechnikai eszköz, amely egy jellemző ionpopuláció kiszűrését segíti. Ez a megoldás elérhető például Orbitrap tömegspektrométerek opciójaként, és nem alkalmas a CCS értékek kísérleti meghatározására. Irodalmi adatok azt mutatták, hogy a FAIMS elválasztás proteomikai méréseknél jelentősen csökkenti a háttérzajt és javítja a kimutatási, illetve kvantitálási határt.<sup>[8-10]</sup>

Amennyire eltérőek lehetnek a tömegspektrométerek, annyira más minden ionmobilitás-tömegspektrométer is. Bár az ionmobilitás-elválasztás műszeres megoldása különbözik a különféle gyártók esetén, és a módszer felbontóképessége általában alacsony, ezek a műszerek új lendületet adtak a proteomikai, metabolomikai és szerkezeti kutatásoknak. Annak ellenére, hogy az ionmobilitás-spektrometria hosszú évtizedek óta fejlődik, a lehetőségek szinte kiaknázhatatlan tárháza még csak most nyílt meg igazán a kutatók számára.

A fehérjék poszttranszlációs módosulásainak pontos azonosítása különösen kifinomult szerkezetkutatási módszereket igényelhet. Sok esetben izomer szerkezetek jöhetnek létre, a módosulatok az MS-mérés során labilisak lehetnek, vagy a fehérjéből keletkező peptidekben egyszerű MS/MS alapján nem lokalizálható egyértelműen a módosítás pozíciója. *Lemr* és *munkatársai* izomer szerkezetű foszfopeptideket vizsgáltak az Alzheimer-kór kialakulásában szerepet játszó tau fehérjéből.<sup>[11]</sup> A mérések során három, különböző pozícióban foszforilezett peptidet fragmentálva izomer szerkezetű fragmens ionokat választottak ki, amelyeket ionmobilitás-szeparációval elválasztottak, majd újra fragmentáltak. Az így kapott adatok alapján igazolni tudták a módosítási helyeket rendkívül alacsony, csupán 0,1 nmol/l koncentrációban is.

*Kevin Pagel* kutatócsoportja fehérjék glikozilációjának vizsgálatában használta az IM-MS technikákat. A humán alfa-1-savas glikoprotein (AGP) N-glikánjait a fehérjéről való lehasítás után HILIC folyadékkromatográfiával választották el és meghatározták az összetételüket.<sup>[12]</sup> A glikánokat ezután IMS-sel vizsgálva képesek voltak elválasztani alfa-2,3- és alfa-2,6- szializációt tartalmazó izomereket is, amelyek pontos szerkezetét fragmenseik alapján azonosították. Eredményeik azt mutatják, hogy az IMS hatékony technika a szializációs és fukozilációs mintázatok felderítésére. Ugyanez a csoport heparán-szulfát szacharidok „shotgun” szekvenálására fejlesztett ki IMS-alapú módszert.<sup>[13]</sup> A komponensek CID fragmentációja után a keletkező fragmensekre meghatározták a CCS értékeket, amelyeket összevetettek ismert szerkezetű referencia molekulák eredményeivel. Az egymással átfedő fragmensek adatai alapján ismeretlen szerkezetű, természetes eredetű szacharidok szerkezetét is képesek voltak meghatározni, ideértve különféle 3O-szulfatált izomereket.

Az ionmobilitás-tömegspektrometria biotechnológiai alkalmazása is jelentős és első-sorban a fehérjealapú gyógyszerek szerkezeti és analitikai vizsgálata során alkalmazzák. *Arndt és munkatársai* egy monoklonális ellenanyag esetén 96,5% szekvenciafedettségű LC-MS/MS peptidterképezési eredményt tudtak elérni egy csupán 20 perces folyadékkromatográfiás elválasztás mellett oly módon, hogy az MS/MS szekvenálás előtt a peptideket egy 13 m úthosszúságú IMS cellában elválasztották.<sup>[14]</sup> Az IMS nagy felbontóképessége lehetővé tette számos, a módosítatlan formával egyébként koelválódó oxidált vagy dezamidált peptid elválasztását, izobár és izomer szerkezetű komponensek megkülönböztetését. A monoklonális ellenanyagok magasabb rendű szerkezete jelentősen befolyásolja azok aggregációs képességét és immunogenitását, ezért a magasabb rendű szerkezet pontos ismerete és nyomonkövetése kulcsfontosságú a fehérjealapú gyógyszerek gyártása és forgalmazása során. IM-MS műszerekben lehetőség van a fehérjék ütközésindukált konformációváltozásának vizsgálatára (collision-induced unfolding, CIU), amelyet például degradációs vizsgálatok során alkalmaznak, vagy pontmutációk hatását vizsgálják a konformerekre.<sup>[15]</sup> *Ruotolo és munkatársai* a módszert IgG-molekulák összehasonlító elemzésére használták hő- és pH stressz hatásának kimutatására, és megállapították, hogy a monomer és dimer formák CCS változásai jelentősen eltérnek a CIU mérések során.<sup>[16]</sup> A CCS ujjlenyomatokból következtetni tudtak az aggregáció során bekövetkező szerkezeti változásokra.

### Ajánlott irodalom

1. Zeleny J. On the ratio of the velocities of the two ions produced in gases by Röntgen radiation; and on some related phenomena. *Philosophical Magazine Series 5*, 1898; 46:120-154.
2. Dodds JN, Baker ES. Ion mobility spectrometry: fundamental concepts, instrumentation, applications, and the road ahead. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2019; 30:2185-2195.
3. Giles K, Ujma J, Wildgoose J, et al. A cyclic ion mobility-mass spectrometry system. *Anal Chem*, 2019; 91:8564-8573.
4. Valentine SJ, Ewing MA, Dilger JM, et al. Using ion mobility data to improve peptide identification: intrinsic amino acid size parameters. *J Proteome Res*, 2011; 10:2318-2329.
5. Meier F, Park MA, Mann M. Trapped ion mobility spectrometry and parallel accumulation-serial fragmentation in proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2021; 20:100138.
6. Oliinyk D, Meier F. Ion mobility-resolved phosphoproteomics with dia-PASEF and short gradients. *Proteomics*, 2022; 23:2200032.
7. Charkow J, Röst HL. Trapped ion mobility spectrometry reduces spectral complexity in mass spectrometry-based proteomics. *Anal Chem*, 2021; 93:16751-16758.
8. Swearingen KE, Moritz RL. High field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) for mass spectrometry-based proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 2012; 9:505-517.
9. Sweet S, Chain D, Yu W, et al. The addition of FAIMS increases targeted proteomics sensitivity from FFPE tumor biopsies. *Sci Reports*, 2022; 12:13876.
10. Hebert S, Prasad S, Belford MW, et al. Rapid and comprehensive single shot proteomics with LC-FAIMS-MS/MS. *Anal Chem*, 2018; 90:9529-9537.
11. Kováč A, Majerová P, Nytká M, et al. Separation of isomeric tau phosphopeptides from Alzheimer's disease brain by cyclic ion mobility mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2023; 34:394-400.
12. Manz C, Mancera-Artu M, Zappe A et al. Determination of sialic acid isomers from released N-glycans using ion mobility spectrometry. *Anal Chem*, 2022; 94:13323-13331.
13. Miller RL, Guimond SE, Schwörer R, et al. Shotgun ion mobility mass spectrometry sequencing of heparan sulfate saccharides. *Nat Commun*, 2020; 11:1481.
14. Arndt JR, Wormwood Moser KL, Van Aken G, et al. High-resolution ion-mobility-enabled peptide mapping for high-throughput critical quality attribute monitoring. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2021; 32:2019-2032.
15. Hernandez-Alba O, Wagner-Rousset E, Beck A, et al. Native mass spectrometry, ion mobility and collision induced unfolding for conformational characterization of IgG4 monoclonal antibodies. *Anal Chem*, 2018; 90:8865-8872.
16. Vallejo DD, Jeon CK, Parson KF, et al. Ion mobility-mass spectrometry reveals the structures and stabilities of biotherapeutic antibody aggregates. *Anal Chem*, 2022; 94:6745-6753.



## 16. ADATELEMZÉS

Csösz Éva,  
Emri Miklós

A korábbi fejezetekben a proteomikai adatgyűjtés bemutatására koncentráltunk. Részletesen megismerhettük a minta-előkészítés és mintafeldolgozás lépéseit, valamint információt nyerhettünk arról, hogy milyen szempontok alapján, az előnyöket és hátrányokat mérlegelve, a rendelkezésre álló lehetőségeket figyelembe véve választhatjuk ki az adott biológiai kérdés megválaszolásához optimális analitikai módszereket. Azt is megismerhettük, hogy a spektrumokból hogyan nyerhetünk peptidszekvenciára vonatkozó információt, és ez alapján hogyan tudjuk megmondani, hogy mely fehérjék, milyen mennyiségben vannak jelen a mintában. Mindezen ismeretek elengedhetetlenek ahhoz, hogy megfelelő minőségű proteomikai adathoz jussunk, viszont sok esetben még nem válaszoltuk meg a kapott eredményekkel a vizsgálatok elején megfogalmazott biológiai kérdést. A proteomikai és tágabb értelemben véve az omikai adatok értelmezése, a bennük rejlő biológiailag releváns információ kinyerése egy komplex kérdéskör, amely elsősorban a bioinformatika tárgykörébe tartozik, és messze túlmutat ezen könyv terjedelmén. Számos könyv és interneten elérhető oktatási tananyag foglalkozik a témával, és nagyszámú program és applikáció áll a kutatók rendelkezésére. Sajnos nincs egyetlen olyan program vagy munkafolyamat (workflow, pipeline), amely felhasználóbarát módon, a proteomikai adatokat használva bemenetként megválaszolná az általunk feltett biológiai kérdést. Ahogy a korábbi fejezetekben bemutatott tömegspektrometriás és elválasztástechnikai módszerek esetén is láttuk, nincs ideális módszer. Minden esetben ismerni kell az adott módszerek előnyeit és hátrányait. Ugyanígy van ez az adatelemzésre és adatvizualizációra specializálódott számítógépes programok és applikációk világában is.

A fejezetben, a teljesség igénye nélkül, néhány ilyen applikációt és számítógépes programot fogunk bemutatni, amelyek segítségével adatokat lehet elemezni. Természetesen, a szoftverek bemutatásának megvan az a veszélye, hogy akár már a könyv megjelenése előtt is, elavulnak, lesz egy másik, jobb, egyszerűbben, felhasználóbarátabb módon használható változat, és akkor az itt bemutatott számítógépes lehetőségek érvényüket veszítik. Éppen ezért nem igazán a szoftverkörnyezetet kívánjuk bemutatni, hanem inkább azokat az elveket, amelyek segíthetnek az adatelemzés megtervezésében, a leginkább megfelelő szoftverek kiválasztásában. Az egyes szoftverek használatát a szoftverek honlapján levő oktatóvideók (tutorial-ok) segítségével viszonylag egyszerű elsajátítani.

A másik fontos és nem elhanyagolható szempont, amit mindig figyelembe kell venni az, hogy az alkalmazható programok és applikációk egy része ingyenesen hozzáférhető. Ezek a lehetőségek megfelelő programozási ismeret birtokában alakíthatók, testre szabhatók, és általában egy fejlesztői közösség áll mögöttük, ahol információt lehet cserélni, az esetleges hibákat ki lehet küszöbölni. A programok és applikációk másik része kereskedelmi forgalomban kapható, többnyire jelentős anyagi ráfordítást igénylő lehetőség, amelyeket nem kell (és általában nem is lehet) alakítani, viszont felhasználóbarát, viszonylag egyszerűen használható környezetet biztosítanak. Megfelelő anyagi forrás birtokában sem egyszerű a választás, mert olyan szoftver, amely minden kérdésünkre választ ad, nem létezik. Mindenképp vala-

milyen kompromisszumot kell kötni, és ezt rendszeresen felül kell vizsgálni a változó lehetőségek függvényében.

A proteomikai adatok elemzésekor hagyatkozhatunk a saját magunk vagy a kollaborációs partner által előállított, vagy szolgáltató laboratóriumban az általunk kiküldött minták vizsgálatából származó eredményekre, vagy letölthetünk proteomikai repozitóriumokból, szabadon hozzáférhető, jó minőségű proteomikai adatokat. A rangos proteomikai szaklapokban történő publikálás kritériuma, hogy az analízisek során nyert nyers és feldolgozott adatokat szabadon hozzáférhetővé tegyünk publikus repozitóriumokban. Az egyik ilyen legnagyobb repozitórium az EMBL-EBI által felügyelt ProteomeXchange (<https://www.proteomexchange.org/>) adatbázis, amely jelenleg több fajból származó, több mint 25000 adatsort tartalmaz.

A fejezetben két kérdéskörrel fogunk foglalkozni. Az egyik a szignifikancia kérdése, a másik pedig a fehérjehálózatok vizsgálata biztosította lehetőségek.

### Szignifikáns változás – az omikai vizsgálatok szent Grálja?

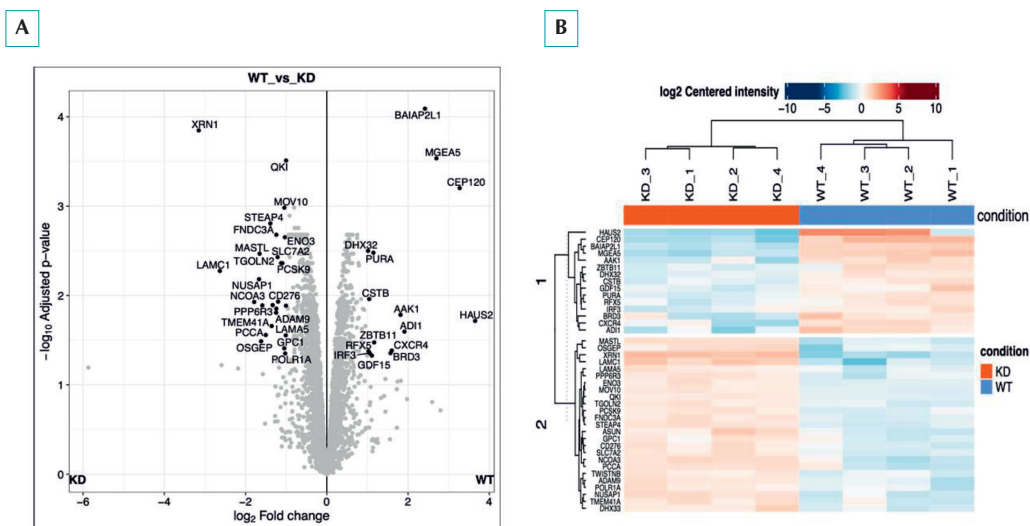
Mennyire fontos az, hogy szignifikáns legyen egy változás? Csak és kizárólag akkor fogadhatok el egy eredményt, ha a változás szignifikáns? Ha ehhez hasonló kérdésekkel bombáznak egy kutatót, természetesen a válasz az, hogy a szignifikancia vizsgálata elengedhetetlen. Általában olyan nagy variabilitással dolgozunk, és ehhez képest olyan kevés a mintaszám, hogy az esetleges változásokat, a biológiai egyedek (donorok) között megfigyelhető egyéni variációt és a soklépéses mintafeldolgozás során okozott különbségeket csak a szignifikáns változások tükrében érdemes vizsgálni, különben hibás eredményeket kaphatunk.

Számos statisztikai módszer létezik, amelyeket a biológiai rendszerekre lehet alkalmazni, de néhány nehezítő tényezővel számolni kell. Az omikai vizsgálatok eredményei csak nagyon ritkán mutatnak normál eloszlást, emiatt meg kell találni az adott eloszlásra alkalmazható statisztikai modellt pl. korrelációk, csoportkülönbségek, variancia-analízis, multilineáris modellek, esetleg gépi tanulási algoritmusok, de ez utóbbi esetekben a mintaszám kritikus az alkalmazhatóság szempontjából. Sokszor szükséges az adatsor normálása, ami különböző paraméterek (belső standardok, a teljes jelintenzitás stb.) alapján végezhető el. Ugyanakkor fontos hangsúlyozni a többszörös összehasonlítás jelentőségét (FDR korrekció, vagy más hipotézis vizsgálat) az első- és másodfajú hiba kiküszöbölésére, valamint kezelni kell a hiányzó értékeket. A biológiai minták vizsgálata során gyakran előfordul, hogy az alkalmazott biológiai és/vagy technikai párhuzamosok nem mindegyikében jelenik meg egy adott fehérje. Ennek több oka lehet, többek között a mérési bizonytalanság, a nem megfelelően reprodukálható minta-előkészítés, nem megfelelően megválasztott módszer stb. Amennyiben nem kezeljük ezeket a hiányzó adatpontokat, úgy a szigorú statisztikai módszerek általában elvetik az ilyen adatsorokat és nem tudjuk felhasználni azokat. A probléma orvoslására olyan eljárásokat (pl. imputáció) fejlesztettek ki, amelyek segítségével pótolni lehet adatokat, viszont ez újabb kérdéseket és problémákat vetett fel a statisztikai analízisek szintjén. Kevés mérési adat esetén statisztikai szempontból nincs korrekt megoldás!

Mivel hasonló problémákkal a nem(csak) proteomikai adatokat használó, gépi tanuláson alapuló klinikai prediktív modellek keresése, fejlesztése során is találkozunk, érdemes az elemzési folyamatba a korszerű adattudomány eszköztárát minél több szinten bevonni. Ebből a szempontból hasznos terület az ún. „*feature engineering*”, ami az elemzés előtti adattranszformációval foglalkozik, vagy az automatizált „*explorative data analysis*”, ami az adathalmazunk statisztikai megismerését támogatja. Az adattudomány fontos eszköze lett az ún. notebook technológia, amivel az adatelemző programok jegyzőkönyv szerűen fejleszt-

hetők és ami lehetővé teszi az elemzés egyszerű reprodukálhatóságát abban az esetben, ha az adatok változnak. A tipikusan R és Python nyelvet használó notebook alapú adatfeldolgozás a lokális számítások mellett lehetőséget ad szerver–kliens architektúra használatára is. Ezzel megoldható, hogy olyan módszereket is alkalmazzunk, amelyekhez nagy számítási kapacításra van szükség, vagy amikor az adatok távoli szerveren vagy valamely felhőszolgáltatónál (pl. Amazon AWS, Microsoft Azure) érhetők el. Ebben az esetben egy laptop-ról egy böngészőn keresztül olyan elemzéseket is futtathatunk, amelyek adattárolási és számítási igénye jóval meghaladja a laptop hardveres lehetőségeit.

A különböző bonyolultságú statisztikai módszerek alkalmazásával<sup>[1,2]</sup> megtalálhatók azok a fehérjék, amelyek statisztikailag szignifikáns változást mutatnak, az angolszász szakirodalom szerint differenciáltan expresszálódnak (DE) az egyes csoportok között. Ez nagyon fontos információt jelent számunkra és az ilyen fehérjék segítségével jobban megérthetjük az általunk vizsgált biológiai rendszer működését. A fejezetben egy példán illusztrálva mutatjuk be a leggyakrabban használt vulkán diagramot (volcano plot) és hőterképet a statisztikailag szignifikáns változások vizualizálására nagy adatsorok esetén (16.1. ábra).



**16.1. ábra.** Proteomikai eredmények megjelenítésére gyakran alkalmazott ábrázolási módok.

**A:** Vulkán diagram (volcano plot), **B:** Hőterkép. Az ábrákat a ProteomeXchange repozitóriumból letöltött PXD030266 proteomikai adatsor LFQAnalyst szoftverrel történő újraelmezésével nyertük.

A kérdés csak az, hogy ha már van ilyen fehérjénk, vagy ilyen fehérjéink, akkor ezek elégségesek-e a vizsgált változás mélyebb megértéséhez? Amennyiben néhány ilyen fehérjénk van, akkor azt más kísérletekben ellenőrizzük, és ha ott is a proteomikai vizsgálattal megegyező eredményt kapunk, akkor nagyobb mintaszámon (lehetőleg több ezer donor bevonásával) az eredményt validálni szükséges. Csak a validálás után fogadhatjuk el az adott fehérjét biomarkerként, amely előrejelezheti egy adott betegség megjelenését, súlyosbodását, esetleg javulását, vagy terápiás célpontként, amelyet megcélozva gyógyszerek tervezhetők.<sup>[3]</sup>

Viszont ha a statisztikai vizsgálatunk eredménye több száz statisztikailag szignifikáns változást mutató fehérjét ad, akkor hogyan választjuk ki, melyek azok, amelyek fontosak lehetnek?

Ugyanakkor, visszatérve kissé az alfejezet elején megfogalmazott kérdésre, felmerül az is, hogy egy komplex rendszerben a változást csak a szignifikánsan változó fehérjék mutatják? Szükséges-e mindig csak és kizárólag a szignifikáns változásokra hagyatkozni?

Az, hogy csak a statisztikailag szignifikáns változásokat fogadjuk el egyfajta minőségellenőrzést jelent, viszont ugyanakkor egy korlátot is, amely miatt biztosan veszítünk információt. Valahogy fontos e kérdésben is megtalálni az arany középutat. A statisztikusok és az omikai kutatásokat végzők állandó vitában állnak, és próbálják legjobb tudásuk szerint, közösen megkeresni a választ a szignifikanciát érintő kérdésekre.

A kizárólag egyes fehérjéket érintő statisztikailag szignifikáns változások keresésén kívül a kapott omikai adatokat kezelhetjük úgy is, hogy figyelembe vesszük a fehérjék közötti kapcsolatokat is.

### Fehérje-fehérje interakciós hálózatok

A fehérje-fehérje interakciós hálózatok tanulmányozása során elsősorban azt a tényt tartjuk szem előtt, hogy a fehérjék a sejtben többnyire nem egyedül végzik feladatukat, hanem fehérje komplexekbe rendeződve, egymással többféle kapcsolatot kialakítva dolgoznak. Amennyiben fel tudjuk rajzolni az egyes fehérjék kapcsolódási viszonyait, és a hálózat-elemzés módszereit használjuk, a kapott hálózatok elemzésére olyan változásokat, törvényszerűségeket is megfigyelhetünk, amelyek az egyes elemek, fehérjék vizsgálatával rejtve maradnak.

A hálózatok vizsgálatának matematikai alapját a gráfelmélet szolgáltatja, amely a hálózatok csomópontjait és az őket összekötő élek viszonyait vizsgálja. A hálózatok felrajzolásához adatbázisokban megtalálható, már korábban leírt, kísérleti bizonyítékokon alapuló adatokat, valamint ezek alapján végzett predikciókat vagy adatbányászat alapján megtalált fehérje-fehérje interakciókat használunk. Ezeket az interakciókat lekérjük adatbázisokból pl. IntAct (<https://www.ebi.ac.uk/intact/home>), String (<https://string-db.org>), és ezek segítségével megrajzoljuk a fehérjehálózatot.

Ahhoz, hogy teljes képet kapjunk, nem használhatunk csak egyetlen adatbázist, mert jelenleg egyetlen adatbázis sem teljes. Viszont, ha több adatbázisból vesszük az adatokat, akkor figyelniük kell arra, hogy az adott adatbázist használó hálózatrajzoló applikáció többnyire nem tudja használni más adatbázis adatait, így a hálózatokat magunk kell megrajzoljuk. Ha nem rendelkezünk megfelelő programozási ismeretekkel, akkor kompromisszumra kényszerülünk, és valamelyik általunk kiválasztott, nem teljes adatbázist véve alapul az adott adatbázis hálózatrajzoló applikációját használva értelmezzük az adatokat. Nem bioinformatikus omikai adatelemzőknek egy jó kompromisszum a StringDB (<https://string-db.org/>) használata, amely folyamatosan bővülő, de nem teljes fehérje-fehérje interakciós adatbázis könnyen használható hálózatrajzoló funkcióval. A String DB<sup>[4]</sup> használata mellett szól az is, hogy az általa készített hálózatok kiexportálhatók és saját hálózatelemző módszereket alkalmazva vagy a felhasználóbarát Cytoscape<sup>[5]</sup> programcsomaggal vizsgálhatók.

Bármelyik változatot is választjuk, fontos szem előtt tartani, hogy az adatbázisokban levő interakciók alapján megrajzolt hálózatok csak az elméleti lehetőséget jelentik az interakciókra. Arról, hogy az általunk vizsgált mintában ténylegesen milyen interakciók vannak jelen, ez nem ad felvilágosítást. Egy lehetőség a probléma kezelésére, ha beépítjük a proteomikai analízisekben mért mennyiségi adatokat is a hálózati modellbe, azaz ún. súlyozott hálózattal számolunk.<sup>[6]</sup> Ezt rávetítve az adatbázisokból letöltött elméleti lehetőségekre jobb képet kaphatunk a mintában levő valós viszonyokról. Figyelembe véve ezt a tényt, valamint az adatbázisok tökéletlenségét, nyilvánvalóvá válnak a hálózati megközelítések korlátai. Ezt

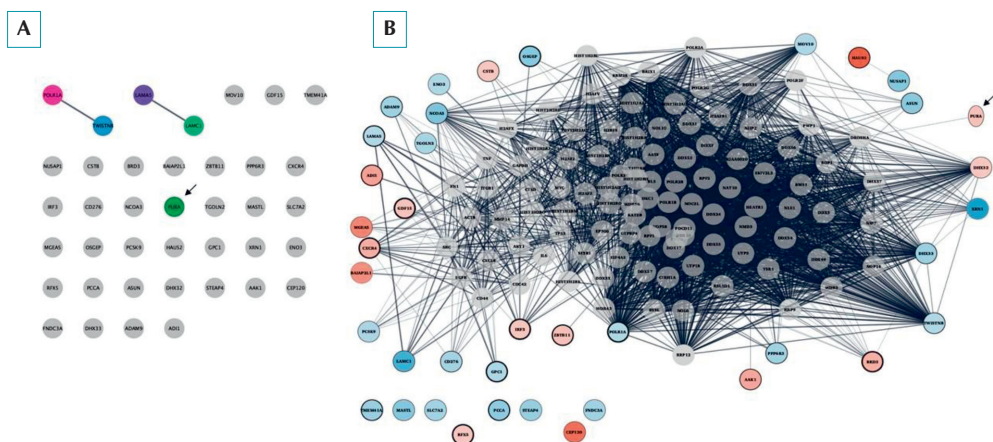
nagyon fontos szem előtt tartani, mert, amint már sokszor említettük, a vizsgálómódszerek tökéletlensége és a rendelkezésre álló adatok hiányos volta nem teszi lehetővé, hogy teljes képet kaphassunk a biológiai rendszerekről. Ezen korlátokat nem elfeledve nagyon sok fontos, más módszerekkel rejtve maradó összefüggéseket fedezhetünk fel a komplex biológiai rendszerek vizsgálata során.

A továbbiakban egy példán keresztül próbáljuk bemutatni, hogy milyen információk nyerhetők ki egy fehérje listából és hogyan lehet többé-kevésbé egyszerűen értelmezni a proteomikai adatokat. A példa csak egy viszonylag felületes értelmezést tesz lehetővé, tulajdonképpen csak segíti a gondolkodást és a biológiai probléma jobb megközelítését, de a mélyebben rejlő összefüggések megkereséséhez mindenképp érdemes bioinformatikus vagy hálózatelemzésben jártas matematikus segítségét kérni.

A hálózatelemzés során a hálózat megrajzolását követően két fő irányt lehet választani. Az egyik a csomópontok és élek viszonyának elemzése a klasszikus hálózatelemzés módszereivel, a másik a hálózatban levő fehérjék funkcionális elemzése, a hálózatra vagy alhálózatra jellemző funkciók feldúsulásának megállapítása. Teljesen mindegy, hogy melyik irányból kezdjük az elemzést, mindkét vizsgálatot fontos elvégezni, hogy teljesebb képet kaphassunk.

A hálózat megrajzolásához munkacsoportunkban az esetek többségében a StringDB adatbázist használjuk, kikeresve azokat az interakciókat, amelyek a proteomikai adatsorunkban szereplő fehérjék között ismertek. Ha túl kevés fehérje van a bemeneti adatokban és csak néhány, egymással nem kapcsolódó fehérjét ad ki az adatbázis, akkor a vizsgált fehérjék elsőrendű interakciós partnereit (az általunk vizsgált fehérjékkel interakcióba lépő, nemcsak a vizsgálati eredményeinkben megjelenő partnerek) is bevonjuk a vizsgálatba (16.2. ábra).

A StringDB által rajzolt hálózatok esetében lekérhetők a feldúsult Gene Ontology (GO) funkciók, mint a molekuláris funkció, biológiai folyamat és a lokalizáció. Ezek alapján a hálózatokra jellemző történések jobban értelmezhetők, viszont figyelembe kell venni, hogy a

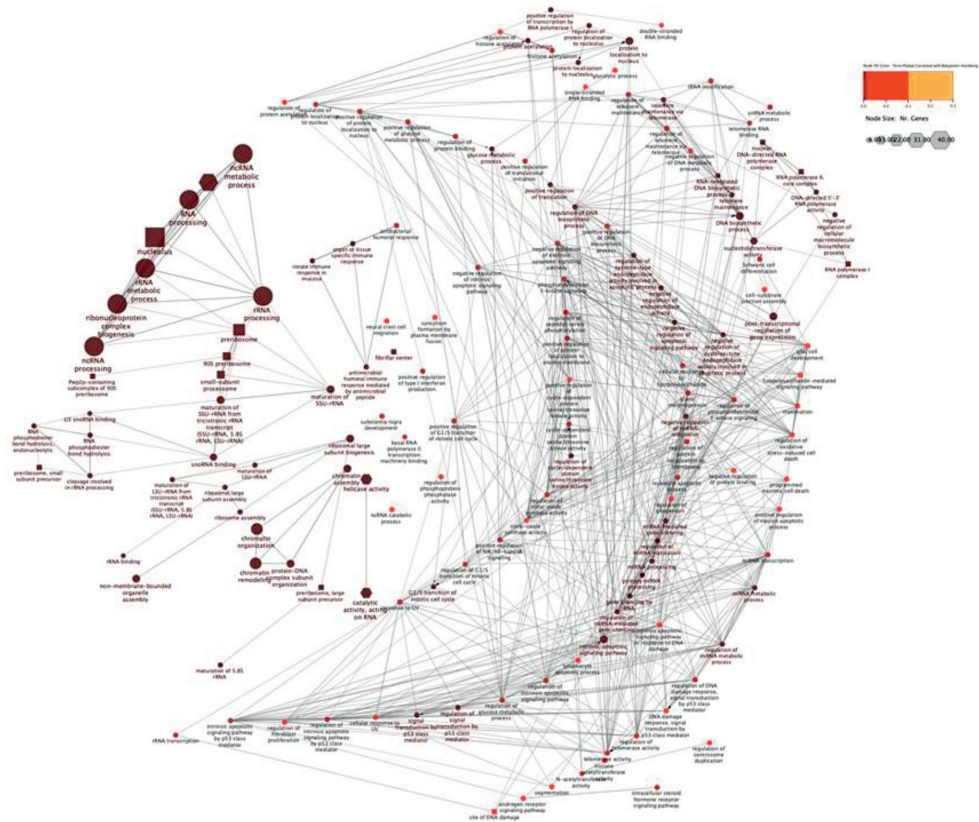


**16.2. ábra.** StringDB segítségével generált fehérje-fehérje interakciós hálózatok.

**A:** A PXD030266 adatsor elemzésével nyert differenciálisan expresszálódó fehérjék hálózata. A differenciálisan expresszálódó fehérjék kevés egymás közötti kapcsolattal rendelkeznek, ezért a továbbiakban a differenciálisan expresszálódó fehérjék elsőrendű interakciós partnereit is bevontuk a vizsgálatba. **B:** Differenciálisan expresszálódó fehérjék és azok elsőrendű interakciós partnereinek interakciós hálózata. Mindkét hálózat esetében a körök a fehérjéket jelölik, feltüntetve a génnevet, a vonalak pedig a fehérjék közötti kapcsolatot jelölik. A nyíl a kísérletben kiűtött PURA fehérjét mutatja.



feldúsult funkció önmagában nem ad felvilágosítást arról, hogy a funkciót mutató fehérjék mennyisége nőtt, vagy csökkent a mintában. A másik lehetőség a funkcionális analízisre a Cytoscape program ClueGo applikációjának használata, ahová be tudjuk tölteni a StringDB által készített hálózatokat és a funkcionális analízist itt végezhetjük el. Ez általában jobban értelmezhető funkcionális hálózatot mutat (16.3. ábra), de nagyon komplex hálózatok esetében nehezen áttekinthető.

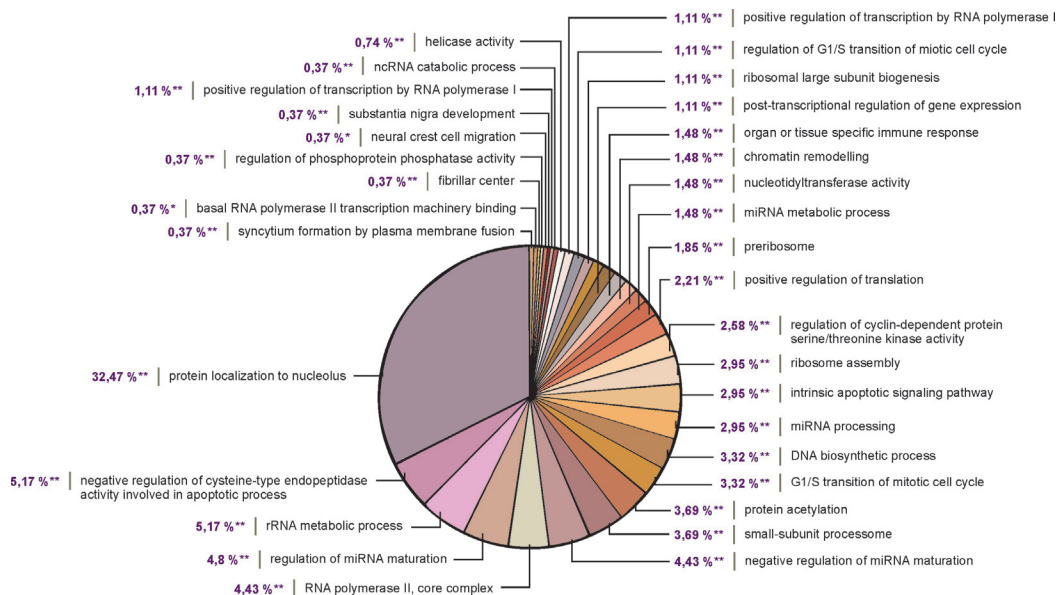


**16.3. ábra.** Az előzőekben bemutatott PXD030266 adatsor Cytoscape-ben történő elemzésével kapott funkcionális hálózat

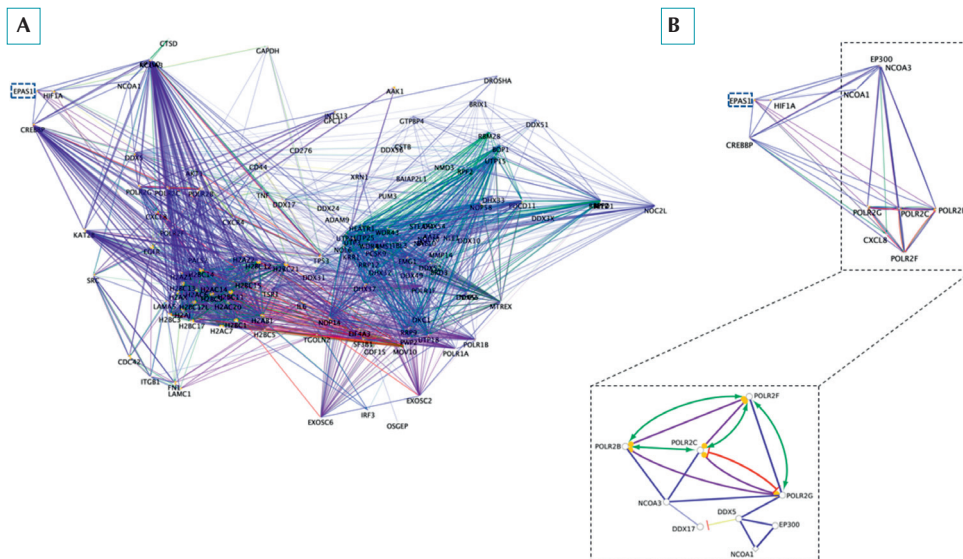
A funkcionális vizsgálat eredményének megjelenítésére gyakran használjuk a kör-diagrammot, amely megmutatja azt is, hogy az adott funkcióhoz tartozó fehérjék hány százaléka teszik ki a hálózatban szereplő összes fehérjének (16.4. ábra).

A Cytoscape-be betöltött hálózatokon a Cytoscape más applikációival hálózatanalízist végezhetünk. Általában érdemes megkeresni a hálózatban központi szerepet betöltő, sok más fehérjével kapcsolódó csomópontokat (hub), mert azok mennyiségi változása várható, hogy a hálózatban egy nagyobb mértékű változást eredményez, mint a kevés kapcsolattal rendelkező, a hálózat periferiáján levő fehérjék mennyiségi változása. A csomópontok vizsgálatára a CytoHubba alkalmazás kiválóan használható.

A CluePaedia alkalmazás segítségével az ún. gén-gén interakciós hálózatok rajzolhatók meg. Ezek az egyszerű kapcsolódási adatok mellett az aktiválás, gátlás, koexpresszió információkat is tartalmaznak, és vizsgálatuk teljesebb képet ad az adott hálózatról (16.5. ábra).



**16.4. ábra.** A ClueGO által elvégzett funkcionális elemzés kördiagramon történő megjelenítése. A funkciók melletti százalékok azt mutatják, hogy az adott funkcióhoz tartozó fehérjék száma hogyan aránylik a hálózatban levő összes fehérje számához.



**16.5. ábra.** A: A PXD030266 adatsor elemzésével nyert gén interakciós hálózat. B: Kinagyított hálózatrészlet. A pontok a fehérjéket ábrázolják, feltüntetve a génneveket is, a vonalak pedig az interakciókat jelölik. A vonalak színe az interakció típusára utal: a piros gátlást, a zöld aktiválást, a lila katalizist, a sárga koexpressziót, a kék kötődést jelent.





A megfelelő adatbázis vagy webfelület kiválasztásakor érdemes figyelni arra is, hogy folyamatosan bővített, jól annotált és megfelelően karbantartott repozitóriumot válasszunk (pl. EMBL – EBI, ELIXIR stb. által felügyelt adatbázisok).

A számos szoftverváltozat helyett használhatjuk az Ingenuity Pathway Analysis (Quiagen) szoftvert is, amely kereskedelmi forgalomban kapható, viszonylag költséges, de egyszerűen használható és folyamatosan bővített és annotált adatbázissal rendelkező lehetőség a hálózatok és útvonalak elemzésére.

Az esetek jelentős részében nem hagyatkozhatunk csak a statisztikai, vagy csak a hálózatelemzési módszerekkel kapott információkra, célravezető ezek kombinálása. Számos differenciáltan expresszálódó fehérje esetében ezek hálózatát szoktuk vizsgálni, vagy a fehérje hálózatokban és alhálózatokban megfigyelt jelenségeket elemezzük statisztikai módszerekkel.

Az omikai adatok elemzésének egy másik szintje, amikor a különböző típusú omikai kísérletekből származó adatokat próbáljuk együttesen elemezni. A genomikai, proteomikai, lipidomikai, metabolomikai vagy egyéb omikai adatokat együttesen, multiomikai megközelítéssel próbáljuk egységes rendszerben kezelni. Ez a terület intenzív fejlődésen megy keresztül jelenleg, igen gyakran jelennek meg szoftverek és applikációk, amelyek különböző típusú omikai adatokat próbálnak együtt kezelni. Még nincs letisztult munkafolyamat, többnyire csak többé-kevésé sikeres próbálkozások látnak napvilágot, de egyértelmű a kutatóközösségben, hogy igen nagy az igény az olyan adatelemző és vizualizációs módszerek iránt, amelyek több omikai adat együttes értelmezését teszik lehetővé. Az Ingenuity Pathway Analysis és a Reactome, hogy csak néhány példát említsek, biztosít lehetőséget a különböző típusú omikai adatok együttes vizsgálatára, viszont további fejlesztések szükségesek, és várhatók a közeljövőben ezen a területen.

Az omikai adatok komplex elemzése jelentős mértékben gazdagíthatja a biológiai rendszerek működéséről szerzett tudásunkat, azonban az elemzés során nagy körültekintéssel kell eljárni. A területen jelentős fejlesztések várhatók a közeljövőben, és egyre elterjedtebb a mesterséges intelligencia alkalmazása is. Előfordulhat, hogy rövid időn belül már teljesen másképp lehetne megírni e fejezetet, viszont a fejezetben megfogalmazott szempontok és a kritikus gondolkodás mindig jó támpontot szolgáltatnak bármilyen adatelemzési folyamat során.

## Ajánlott irodalom

1. Schwämmle V, Hagensen CE, Rogowska-Wrzesinska A, Jensen ON. PolySTest: Robust statistical testing of proteomics data with missing values improves detection of biologically relevant features. *Mol. Cell. Proteomics*. 2020; 19:1396–408.
2. Pursiheimo A, Vehmas A, Afzal S, et al. Optimization of Statistical Methods Impact on Quantitative Proteomics Data. *J. Proteome Res.* 2015; 14:4118–26.
3. Geyer PE, Holdt LM, Teupser D, Mann M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Mol. Syst. Biol.* 2017; 13:942.
4. Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49:D605–D612.
5. Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models. *Genome Res.* 2003; 13:2498–506.
6. Csoz E, Tóth F, Mahdi M, et al. Analysis of networks of host proteins in the early time points following HIV transduction. *BMC Bioinformatics*. 2019; 20:1–18.
7. Gillespie M, Jassal B, Stephan R, et al. The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucleic Acids Res.* 2022; 50:D687–D692.

## **17. PROTEOMIKA, RENDSZERBIOLÓGIA, „UNBIASED” KUTATÁS**

Juhász Gábor

Az élő anyagról való tudásunk nagy fejlődésen ment át az utóbbi évszázadban. Kezdetben úgy gondoltuk, hogy egy Brown-mozgással mozgó diszperz kolloid rendszert alkot a citoplazma, amelyben a mikroszkóposan detektálható organellumok rendezetlenül mozognak. A citoplazmát alkotó fehérjék pedig nagy amfoter molekulák, melyek alakjukat változtatva szabadon mozognak a citoplazmában. Rendezettség és strukturáltság csak az organellumokban, illetve bizonyos szövetekben, mint az izomszövet, alakul ki. A proteinek másodlagos és harmadlagos szerkezetének vizsgálatával, a röntgen-kristallográfia és az NMR alkalmazásával azonban világossá vált, hogy a fehérjék általában több energiaminimumot jelentő állapot között tudnak változni, amihez energia befektetés kell. Arra is fény derült, hogy a citoplazma egyáltalán nem egy diszperz, Brown-mozgást produkáló összetett rendszer, hanem molekuláris struktúrája van, amiben több fehérje komplexe egy energetikailag stabilis állapotban funkcionál. Tehát a sejtek kis kompakt fehérje-lipid-nukleinsav komplexekből épülnek fel és az egyes molekuláris kompartmentek funkcionálisan is eltérőek. Nemcsak az organellumokra érvényes ez az elv, hanem a látszólag strukturálatlan citoplazma részekre is. A strukturálatlanság elképzelése tehát a vizsgálati módszerek korlátai miatt alakult ki és nem a valóságot tükrözte.

A sejtek működése során az egyes kompartmentek közti anyagcserélődés és molekuláatadás egy nagyon komplex, becsülten több millió proteoformából álló kötési energiákkal összetartott rendszerben zajlik. Mai terminológiát használva kis molekuláris gépek állnak össze egy sejtbe, amelyben nagyon dinamikus tér, idő és molekula darabszám változások folynak. Túl vagyunk a redukcionista biokémia nagy korszakán, amikor a szervezetekből izolált egyes fehérjéket kémiai módszerekkel behatóan tanulmányozták, feltárva a szerkezet és funkció összefüggéseit. Bár ma is folynak ilyen kutatások nem is kis számban, de kiderült hogy ha különböző fehérjéket összetesszünk egy kis heterooligomerré, akkor abban az egyes komponensek tulajdonságai változnak a vizes oldatban mérhetőhöz képest. Ismertté vált tehát, hogy az életfunkciókban fehérje komplexek vesznek részt, amikben a komplexitás szerepe nem elhanyagolható, azaz nem elég a fehérjék *in vitro* kémiai és szerkezeti vizsgálata, hanem a fehérjék valós komplex rendszerekben történő kölcsönhatásain alapuló kooperatív működését is fel kell tárni. Helye van tehát olyan vizsgálatoknak, amelyek az élő protein struktúra komplexitásának megtartása mellett végeznek funkcionális kutatásokat. Ez nehezebb, mint az *in vitro* szerkezeti biokémiai kutatás, és a módszereink is viszonylag kezdetlegesek a probléma komplexitásához képest. Párhuzamosan, a genetikai információról alkotott kép is változott. Eleinte úgy gondoltuk, hogy gének milliói, az élő sejt minden részletére kiterjedően, pontosan leírják az élőlényeket. Azaz, ha ismertté válik a teljes genom, akkor abból minden információt meg tudunk szerezni az adott élőlényre vonatkozóan. Ma már látjuk, hogy a fehérjére lefordítható gének száma emberben 20 000 körül van csupán (<https://hupo.org/hpp-progress-to-date>), ugyanakkor az egyes életfolyamatokban részt vevő fehérjemódosulatok, proteoformák száma jóval magasabb ennél. Ennek következtében pl. felértékelődött az „alternatív splicing” jelentősége, amely során egy génből akár negyven protein is készülhet, valamint az egyedi nukleotid polimorfizmusok (SNP) és a poszttranszlációs módosítások szerepe is jelentős (lásd 2. és 3. fejezet).

Mivel a fehérjék az mRNS kódjukról íródnak át, kézenfekvő lenne, hogy a transzkriptom változásából következtessünk a proteom változásaira. Ezzel azonban több jelentős probléma van. Egyfelől a konverzió az mRNS-fehérje viszonylatában *in vivo* nehezen mérhető, ezért nem is ismertek a szabályok, csak annyi, hogy maga az mRNS-változás többnyire csak a fehérjeváltozás irányával egyezik, a mértékével nem. További komplikációt vet fel az a tény, hogy a gének átírása után az mRNS kijutva a sejtmagból átíródik fehérjévé, miközben jelentős idő telik el, gyakran több óra. Mivel az RNS bomlása nagyon gyors, a kópiaszám hamar nullára csökken, illetve csak azok a kópiák vannak jelen, amelyek riboszómához kötöttek. A meginduló fehérjeszintézis sokkal lassabb, a fehérjekoncentráció csak órák múlva nő meg. Hasonlóan a fehérjék degradációja is lassú, néha nagyon sokáig megmarad egy protein a sejtekben. Az időzítések és a bomlási és átírási sebességek pontos ismerete nem áll rendelkezésre csak néhány fehérje esetében van róla irodalmi adat. Bonyolítja a helyzetet az is, hogy a kvantitatív összefüggés a keletkező proteinláncok száma és az mRNS-szálak száma között ismeretlen. Tudjuk, hogy vannak kevés, közepes és nagy kópiaszámú átíródó fehérjék, azonban nem tudjuk, hogy ez a jellemző konstans, vagy esetleges és stochasztikus. Ugyanakkor a gének átírása ismereteink szerint nem folyamatos, hanem hullámokban történik, ráadásul csak ritkán íródik át egyetlen gén, sokkal inkább génlavinák íródnak át, amelyben bizonyos gének átíródása kapcsolatosan történik. A szabályok megértésére kutatások folynak a genetikusok részéről, de egyelőre kvantitatív becsléseket nem tudunk tenni. Ismereteink arra korlátozódnak, hogy ha egy mRNS kijut a sejtmagból az nagy valószínűséggel át is íródik, de a legtöbb esetben nem tudjuk, hogy egy mRNS-kópia hányszor íródhat át. Vannak olyan citoplazmában zajló átírást szabályozó folyamatok is, melyek biztosítják, hogy az átírás a szükségleteknek megfelelően történjen. Mindezek torzítják a mért mRNS-protein arányt. Jelenleg alapszabálynak tekinthető, hogy egy átlagos fehérje emelkedett szintjéhez 5-6 órányi idő kell az mRNS-szint megemelkedéséhez képest, azonban vannak akik ennek kétszeresét tartják reális értéknek. Nehéz objektív döntést hozni ilyen kérdésekben, mert egy fehérje aktuális szintje függ az expresszió mértékétől (ami mRNS mennyiség függő), de degradációtól is. Amit mérünk, az a transláció, lebontás és diszlokáció eredménye. Figyelembe kell venni a korábban írtakat is, azaz, hogy a gének transzkripciója hullámokban megy végbe. Egyszerre több gén íródik át egy transzkripciós hullámban, majd az átírás leáll.

A géntranszkripció több szinten történő szabályozása miatt a géntranszkripcióból a fehérje összetétel egy sejtben nem jósolható.

A fehérjék komplex biológiai környezetben való vizsgálatára jött létre a proteomika, melynek fő célja a biológiai működések komplex fehérje mechanizmusainak feltárása. A proteomika a rendszerbiológia részeként alakult ki a genomikát követve.

A Humán Genom Projekt kapcsán felépült hatalmas génszekvenálási adatbázisok tették lehetővé, hogy a géneket és a splicing variánsokat számítógépes módszerekkel konvertáljuk fehérjékké, sőt azokat is megjósoljuk, amelyeket még gyakorlatban nem sikerült izolálni a szervezetből. Megfordítva, a génekből extrapolált primer szekvenciákat összevetve az adott fehérjéből származó peptidek szekvenciáival, a kérdéses fehérje azonosítható. Ez azt jelenti, hogy nem kell az összes feltételezett fehérjét egyesével szekvenálnunk költséges és lassú eljárásokkal, hanem például tripszines emésztés után, a kapott fragmentumokból, ha 2–5 illeszkedik egy adatbázisban tárolt fehérje szekvenciára, akkor az a fehérje nagy valószínűséggel jelen van a mérési mintánkban. Ez a lehetőség volt a kulcs a proteomika létrejöttéhez, mivel a korábbi fejezetekben részletesen tárgyalásra került tömegspektrometriás módszerek így lehetővé tették a fehérjék azonosítását és kvantitatív mérését nagyon komplex elemekből. Azonban a jelenlegi mérés technika nagyfokú fejlettsége sem teszi lehetővé, hogy egy szöveti minta teljes proteomját láthassuk. A mai becslések szerint szerencsés esetben a

proteom 15–20%-át tudjuk azonosítani egyszerre egy mintából, tehát az egész proteomot nem láthatjuk, hanem annak egy fragmentumát csak, ami maximum néhány ezer fehérje. Be kell látni ezt a korlátot, ugyanakkor ez a 15–20% is hatalmas előrelépés az *in vitro* rendszerek kevés molekulát használó módszereihez képest. A proteomika tehát jóval több, mint a fehérje készletek kvantitatív és kvalitatív detektálása, beletartozik a kölcsönhatási hálózatok megértése és a dinamikus változások tér és időbeli vizsgálata is. A mai technológiai szinten a proteomika segítségével olyan adat-alapú munkahipotézisek állíthatók fel, melyeket klasszikus kísérletekkel validálni lehet. A változások töredékének méréséből kell tehát a meglévő tudás alapján integrált, funkcionális modellekig eljutni.

A rendszerbiológia definíciója általános. *Mindazon molekuláris kölcsönhatások komplex és dinamikus összességét értjük alatta, ami egy valós fiziológiai vagy patológiai probléma mögött van.* Élesen elkülönül tehát a rendszerbiológia, mint molekuláris komplexitás alapú diszciplína a biológiai rendszerek szupramolekuláris vizsgálatától. Nem része a hálózati modelleken alapuló, komplex ökológiai vagy populációdinamikai kutatás sem. A rendszerbiológiának számos ága van, mint a genomika, transzkriptomika, proteomika mellett a metabolizmussal foglalkozó metabolomika vagy a lipidekkel foglalkozó lipidomika. A rendszerbiológiai tudományokat metodikailag az fogja össze, hogy mindegyik egyszerre nagyon sok molekulát mérő, pásztázó eljárásokat alkalmaz. Következésképpen egyszerre nagy adathalmazokat generál, amelyeket ún. „big data” eljárásokkal lehet csak elemezni, és meglehetősen problematikus a változások szignifikanciájának becslése. Az eredmények interpretációja gyakran nagy adatbázisokon alapuló bioinformatikai módszerekkel történik, mint a gén-ontológiai adatbázisok vagy a protein adatbázisok (SWISSPROT, NextProt, PDB, GenCard stb.). A rendszerbiológia adja azt a komplex keretet, amelyben a proteomikai mérési eredményeket el lehet helyezni. A klasszikus redukcionista biokémia és molekuláris biológia ún. „biased” módon működik, azaz felállítanak egy nullhipotézist, és a mérések az attól való eltérést vagy azonosságot vizsgálják, igen-nem, nő-csökken válaszokat adnak. A biased kísérletek megismételhetősége is sok gondot okoz, mert a leggyakrabban használt statisztikai eljárások csak az adott adathalmazok különbségeire adnak szignifikanciaadatot, a megismételhetőségre nem. Arra a Bayesian statisztikai eljárások vonatkoznának, de a biased kísérleti felállásban ritkán keletkezik számos, függetlenül mért, parallel adathalmaz ugyanabból a kísérletből. A rendszerbiológiai adatok esetében gyakran alkalmaznak főleg „R”-ben írt Bayesian statisztikákat, ahol sok parallel adat áll rendelkezésre ugyanazokból a mintákból, de az adatok függetlensége gyakran vitatható, mert pl. a gének transzkripciója nem függetlenül, hanem csoportosan szabályozott. Hasonlóan a proteomikai eredményekben a fehérjék koncentrációi is összefüggenek hiszen *in vivo* a fehérjék bonyolult, összekapcsolt struktúrákat alkotva nem véletlenszerű, hanem szabályozott arányokban vannak jelen a sejtekben, stabil sztöchiometriával. Bonyolítja a helyzetet az is, hogy számos szövetből csak nagyon heterogén, többféle sejtípust tartalmazó minta vehető. A mérések relevanciája ilyenkor azon múlik, hogy tudunk-e egysejt szintű információt is nyerni, legalább egy sejtípusra releváns adatot. Az egysejt-transzkriptomika ma az egyetlen módszer, amellyel az egyes sejtek éppen átírásban lévő összes génterméke szinte kivétel nélkül mérhető, de nem a fehérjék szintjén. A transzkriptom az amplifikációs technológiák miatt sokkal érzékenyebben mérhető, mint a proteom. Mivel a nukleinsav-polimerek sokszorosíthatók, míg a fehérjék nem, a nukleinsavakból 1-2 kópia már mérhető, ezzel szemben az egysejt proteomika még nagyon kezdetleges problémákkal küzd. Az egysejt proteomika ma maximum 3000 fehérjét tud azonosítani ugyanabból a mintából, amelyből sejtenként 19 000 RNS-variáns is kimutatható. Azaz elmondható, hogy a mai technológiai fejlettségünkön az egysejt proteomika még kezdeti, de felfutó fázisban van. A proteomikai vizsgálatokra általánosságban jellemző, hogy a proteom



egy kis részét mérve kell következtetni a proteom egészének változásaira. Ez, a meglévő tudásanyag hiányában csak nehezen oldható meg, ami az eredmények interpretációjakor jelentős korlátot eredményez. A megoldás legtöbb esetben azon múlik, hogy a genomikai és transzkriptomikai információ rendelkezésre áll vagy sem. Rendelkezésre állnak-e jó adatbázisok és bioinformatikai eszközök. Itt érkezünk el oda, hogy a proteomika csak egy része annak a molekuláris, komplexitás alapú biológiai szemléletnek és kutatási iránynak, amit közösen rendszerbiológiának hívunk. Tehát egy biológiai kérdés komplex megközelítése nem áll meg a proteomikai mérésnél, hanem egy hálózati modellezés és egy transzkriptomikai vizsgálat szükséges az adatalapú munkahipotézis felállításához. Majd klasszikus biased kísérletekkel az adatalapú munkahipotézist validálni kell, vagy elvetni, ha nem sikerül a hipotézis validálása.

Az élő fehérjék a sejtekben egy energetikailag jól definiált állapotban egyetlen nagy komplex hálózatot alkotnak, amelyben minden molekulának megvan a maga helye és darabszáma. Ami ebből a komplex mátrixból kilóg, azt a proteázok eltávolítják. A sejt tekinthető lokálisan működő és sejtszinten összekapcsolt, kis fehérje és nukleinsav alapú gépek összeszervezett rendszerének, ami dinamikusan követi a külső behatásokat és optimalizáltan működik, amikor az egészségesnek nevezett egyensúlyi állapotban van. Ha a molekuláris komponensek vagy azok darabszámai megváltoznak, megváltozik a működés is. Mindez azt jelenti, hogy van egy fiziológiás tartomány, amiben ez a komplex rendszer egy sokdimenziós állapottérben mozog, és amint kimozdul ebből az állapottérből, vagy másik sejtípusá változik, vagy patológiásan kezd működni. Számos olyan fehérjét ismerünk, ami multifunkcionális, illetve szerkezetileg is több stabil állapotban tud létezni, ami igazolja ezt a komplex hálózati dinamika modellt. Egyetlen sejtből a mai technológiával főleg a legnagyobb abundanciájú fehérjék mérhetők, ezért olyan heterogén szövetekből, mint az agy, a mért eredmények relevanciája gyakran vitatható. Megoldás lehet a sejtípusok markerei alapján FACS-szal szeparálni megfelelő számú azonos típusú sejtet. A sejtípus markerek azonban gyakran átfednek vagy félrevezetőek és leginkább az aktuális emberi tudást tükrözik, s nem a valós biológiát. Ugyanis a sejtek működése a proteom plaszticitásával jár, és a sejtípusok ezáltal gyakran időlegesen. Egyes sejtípusok egymásba alakulhatnak, illetve felmerül a típus vagy állapot problémája. Olyan esetekben azonban, amikor egyértelmű a minta és a funkció összefüggése, mint pl. az idegrendszerben a szinaptoszóma preparátumok esetében, akkor a proteomikai mérések lefedettsége és specifitása jelentősen növelhető.

A rendszerbiológiai módszerek segítségével szöveti vagy sejtfragmentumokból származó minták adataiból tudunk információt nyerni, amely minták azonban erről a nagyon dinamikus élő rendszerről csak pillanatfelvételeket nyújtanak. Mindezek alapján felvetődik a kérdés, hogy mit lehet reprodukálhatóságnak értelmezni a rendszerbiológiai mérésekben. Egyértelmű, hogy egy minta többszöri lemérése információt ad a reprodukálhatóságra, de a különböző minták esetében a konkrét adatok a dinamikus változás miatt gyengén reprodukálhatók egyesével. Azonban az egyes fehérjék által indexált biológiai molekulahálózatok és maga a funkció jól megismételhető. Más szóval, ha azonos kísérletből több alanyból kivett mintákat vetünk össze, akkor a biológiai folyamatok és azok hálózatainak érintettsége reprodukálható, de az hogy mindig pontosan ugyanaz a fehérje nő vagy csökken az ritkábban fordul elő. Sokan megijednek ettől, pedig mindez annyit jelent, hogy folyamatosan változó élő szervezeteket vizsgálunk.

A fehérjék hálózatokba szerveződött molekuláris gépként való működése felveti, hogy ha analitikai szempontból egyes fehérjékre kell szétbontani egy sok ezer elemből álló komplex rendszert, akkor energiát kell befektetni, de sem túl nagyot, sem túl kicsit, hogy az egyes elemek maguk ne sérüljenek, de a komplex szétbomoljon. A fehérjéket tehát szeparálni kell

egymástól kromatográfiás vagy más eljárásokkal, majd meg kell akadályozni, hogy a fehérjék *in vitro* elkezdjenek újraszerveződni komplexekké, oligomerekké vagy fehérje-lipid részecskékké. A genomszekvenálás nem érzékeny a gének számára, de a proteomikai technikák és főleg a tömegspektrometriás módszerek igen a fehérjék esetében. Az ilyen komplex rendszerek szétválasztásával külön tudományterület foglalkozik, az elválasztástechnika. A fehérje analitikai módszerek ezért vannak kombinálva elválasztástechnikai rendszerekkel, mint a kapilláris kromatográfia, kapilláris elektroforézis, vagy a 2D gélelektroforézis. Ezeket a technikákat az egyes tömegspektrometriás módszereknél részletesen ismertettük. Érdemes azonban felhívni a figyelmet arra, hogy a korábbi fejezetekben tárgyalt elválasztástechnikai és dúsítási eljárások alkalmazása erősen befolyásolja a reprodukálhatóságot és a kvantitatívítást is. Az egyes lépések szórásai összeadódnak. Ha hozzátesszük, hogy jó esetben is csak egy töredékét látjuk a mintát alkotó proteineknek, akkor a levonható biológiai következtetések erősen függenek a mérési technológia felbontásától és szenzitivitásától. Kulcsfontosságú az egyes ismertetésre kerülő proteomikai tömegspektrometriás módszerek esetében tehát a mérés saját hibájának ismerete és annak becslése, hogy a teljes proteom mekkora hányadát tudjuk detektálni. A proteomikai, bioinformatikai és adatbányászati technikák ugyan kicsit szélesíthetik a mért adatok felhasználhatóságát, azonban nem téveszthetjük szem elől, hogy az omikai metodikák adataalapú munkahipotézis gyártási módszerek, amelyek eredményeiből nem megoldások, hanem munkahipotézisek keletkeznek, amiket később klasszikus kísérletekkel validálni kell, vagy el kell vetni. A használt mérés technika pedig alapjában megszabja a felállítható munkahipotéziseket. A mérési limitek mellett tehát a munkahipotézisek lehetőségének limitjeit is ismerni kell. Például egy kis érzékenyséű mérésben kiemelten sok a vázfehérje, ami sejtváz változási hipotéziseket sugall annak ellenére, hogy számos más változást is látunk. Mindezek hátterében az áll, hogy közismerten a vázfehérjék abundanciája magas a szöveti mintákban. Az egyes biológiai funkciók protein hálózatait a meglévő ismeretanyagból rekonstruálva azonban jó becslés adható az adott folyamat lefedettségére egy konkrét mérésben. A lefedettség egy nagyon fontos adat, növelésére számos lehetőség kínálkozik. Például, ha a mitokondriális anyagcsere változására vagyunk kíváncsiak, akkor mitokondrium preparátumokon érdemes dolgozni, teljes szöveti minta helyett, mert így a mérések jobban lefedik a mitokondriális proteomot, továbbá a más struktúrákból származó fehérjék nem fedik el a mitokondriális fehérjék változásait. Általánosan belátható, hogy a sejtfractionálási módszerek alkalmazása növeli a lefedettséget, amennyiben a vizsgálni kívánt biológiai folyamat egyes sejtkompartmentekre korlátozható. Természetesen a frakcionálás járhat veszteségekkel is.

Itt kell megjegyezni, hogy a proteomika jelenleg főként a minta fehérje összetételével és annak kvantitatív jellemzőivel, valamint a poszttranszlációsan módosított formákkal foglalkozik. Gyakran azonban a fehérjék lokalizációja van a biológiai jelenségek mögött, ezért a molekulák dinamikus áthelyeződését is szükséges vizsgálni, ugyanis funkcionális szempontból az is változás, ha egy adott fehérje a sejt egyik kompartmentjéből a másikba megy át. Például az endoplazmatikus retikulumból kikerül a mitokondriumba. Ez funkcionálisan nagyon nagy hatású lehet, de a homogenizált mintákban nem látható a változás a teljes koncentrációban. Nagyon gyakori az ilyen reguláció a proteomban, mint pl. a neurotransmitter receptorok internalizációja vagy externalizációja, ami totális koncentrációváltozás nélkül okoz hatalmas átviteli kapacitás bővülést a szinapszisokban. A proteomikai méréseket tehát a szuper-rezolúciós mikroszkópiával vagy a krio-elektron-mikroszkópiával is érdemes kombinálni. Ilyenkor fontos, hogy a tömegspektrometriásan mért minta egy része kerüljön más módszerekkel is felhasználásra a mintaazonosság miatt.

A fehérjék térbeli átrendeződését a leggyakrabban ultracentrifugálási lépések beiktatásával nyert sejtservecskék nagy áteresztőképességű proteomikai vizsgálatával tanulmá-



nyozzák (LoPIT technika), de gyakran kombinálják többszörös immunfestés után végzett nagyfelbontású mikroszkópiával is. A Human Proteome Atlas egy folyamatosan bővülő adatbázis, amely kombinálja a rendelkezésre álló információkat és a fehérjék lokalizációjáról (is) pontosabb képet ad.

Hasonlóan nagy probléma az excitabilis szövetek proteomikai vizsgálata. Kizárásos alapon, az idegrendszeri proteom az, amelybe a külvilág információi beíródnak, tehát ha szöveti mintákat gyűjtünk, akkor fontos az azonos fiziológiai állapot biztosítása. A proteomika tehát az állapotfüggő változásokat is relevánsan tudja feltárni, ha a fiziológiai mérésekkel kombináltan alkalmazzuk. A mérések során a szignifikánsan változó fehérjékre vagyunk kíváncsiak, a különbségeket pedig csak akkor lehet egyértelműen a funkcióhoz kötni, ha minden más külső hatás azonos. Nem csak az fontos, hogy pl. kísérleti állatok vizsgálatakor a genetikai állomány, azaz a törzs legyen azonos, hanem az állatok kora, neme és fiziológiai állapota is. Megjegyezzük, hogy a humán agyi proteomikai eredmények relevanciájában a legzavaróbb tényező a minta heterogenitása. A fiziológiai állapot és az előélet, az esetleges korábbi betegségek annyira heterogénné teszik a mintákat, hogy jobban befolyásolhatják az eredményeket, mint a genetikai heterogenitás a páciensek között. A humán alkalmazhatóság esetében nagyon körültekintően kell eljárni az eredmények interpretációjakor, de már a mintaválasztás periódusában is gondolni kell rá. A minta homogenitás szempontjából a szövettenyészetek vagy túlélő szövetszeletek alkalmazása sem nagyon egyértelmű. A szövettenyészetekben a sejtek nagy távolsága és az extracelluláris mátrix jelentősen eltérő volta miatt legtöbb esetben a valóságtól jelentősen eltérő rendszert vizsgálunk és az adatok translációja kérdéses. A szövetszeletekben sok az elhalt vagy elhalóban lévő sejt, amelyeknek a fals reakciói a proteomikai mintát nehezen értelmezhetővé teszik. Ilyenkor a paraméterek stabilitására kell nagy hangsúlyt fektetni. Lényegében arról van szó, hogy a proteomikai technológiák mai fejlettsége, a minta méretek és heterogenitásuk, a különböző preparátumok korlátai mind nagyon limitálják a kísérletek relevanciáját. Bár szinte minden két minta közt lehet találni protein különbségeket, az eredmények értékét a kísérlettervezés és az interpretációs limitok ismerete nagyon befolyásolja.

Ezért bír nagy jelentőséggel a korábbi fejezetekben tárgyalt előnyök-hátrányok, limitációk és technikai korlátok ismerete minden analitikai módszer esetében. Fontos hangsúlyozni, hogy ideális vizsgálómódszer nem létezik. Mindig az adott kérdés megválaszolásához szükséges és elégséges, a rendelkezésre álló lehetőségeket figyelembe vevő optimális módszert kell választani.

*Összefoglalva*, a fehérjék komplexitáselvű kutatásának és a biológiai funkciók háttérében lévő fehérje komplexek feltárásában hasznos proteomikai kutatás jelenleg az adatalapú munkahipotézisek unbiased felállítására alkalmas, amelyből a biológiai mechanizmusokat klasszikus kísérletekkel kell tovább vizsgálni. A proteom és a transzkriptom közti összefüggések hiányos ismerete folytán nehéz releváns adatokat nyerni heterogén szövetekből. Valamint általánosan igaz, hogy szignifikáns különbségeket mérni sokkal könnyebb, mint azokból releváns és biológiailag hasznos információt kinyerni. Pontosan ezért gondoljuk úgy, hogy a tömegspektrometriás mérés technika proteomikai vonatkozásainak mély ismerete nélkül reménytelen megfelelő és biológiailag is értelmes eredményekhez jutni.

### Ajánlott irodalom

1. Digre A, Lindskog C. The Human Protein Atlas-Spatial localization of the human proteome in health and disease. *Protein Sci.* 2021; 30:218–33.
2. Geladaki A, Kočevar Britovšek N, Breckels M, et al. Combining LOPIT with differential ultracentrifugation for high-resolution spatial proteomics. *Nature communications.* 2019; 10:331.

## **18. HAZAI PROTEOMIKAI KUTATÓLABORATÓRIUMOK**

Magyarországon több kutatólaboratóriumban végeznek proteomikai analíziseket, de jelenleg hét olyan laboratórium van, ahol a kutatás elsődleges célja a proteomikai technikák fejlesztése, optimalizálása és a kifejlesztett módszerek alkalmazása változatos analitikai kérdések megválaszolására. A kapott eredmények számos élő- és élettelen természettudományi, biológiai vagy orvosi, valamint biotechnológiai probléma megoldását, jobb megvilágítását segítik elő.

A megfelelő technikák alkalmazása a szaktudás mellett, egy korszerű műszerpark meglétét, naprakész használatát és folyamatos fejlesztését feltételezik. Ezen laboratóriumok a saját kutatási kérdéseik megválaszolása mellett, több éves szaktudásuk és műszerparkjuk révén segítenek megválaszolni a hazai és külföldi kollaborációs partnerek analitikai kérdéseit, és aktívan részt vesznek (többnyire) bonyolult orvosi, biológiai, környezeti, élelmiszer-vagy gyógyszeripari, avagy biotechnológiai problémák megoldásában.

Ebben a fejezetben bemutatkoznak a hazai proteomika laboratóriumok röviden ismertette az általuk vizsgált legfontosabb kutatási kérdéseket, valamint az elérhető módszereket és technológiákat. Amennyiben kérdés merülne fel, a megadott elérhetőségeken lehet keresni a laboratóriumok munkatársait, akik készséggel próbálják legjobb tudásuk szerint megválaszolni a felmerülő kérdéseket.

## ELTE TTK Biológiai Intézet Proteomikai Laboratórium

Laboratóriumunk a proteomikát az NIH definíciója szerint értelmezve, az idegrendszeri folyamatok komplex, fehérje-kölcsönhatásokon alapuló molekuláris mechanizmusait kutatja. Elsőként vezettük be a kétdimenziós differenciál gélelektroforézis (2-D DIGE) technikát az országban és elsőként alkalmaztunk a protein és gén interakciós hálózatok építésére alkalmas, hálózati modellező programokat (PathwayStudio® 6.2 software (Ariadne Genomics) a proteomikai eredmények funkcionális értelmezése érdekében. Az idegtudományokban elsőként vezettük be az OMICS technológiákat az országban.

Laboratóriumunk rendelkezik két 2-D DIGE munkafolyamatra alkalmas eszközállománnyal, egy Typhoon TRIO+ szkennerral és a 2-D DIGE értékelésére alkalmas szoftverekkel: DeCyder szoftver csomag (Differential In-gel Analysis és Biological Variance Analysis modul) és Image Quant szoftver (GE Healthcare). Kísérleti munkáink során mindkét fluoreszcens jelölőtechnikát (Minimal dye és Full stain) alkalmazzuk annak függvényében, hogy a mintáinkban milyen koncentrációban vannak jelen a fehérjék (a Minimal dye-hoz 50 µg, míg a Full stain jelöléshez 2–5 µg koncentráció szükséges). Kísérleti munkáink főleg idegrendszeri betegségek kutatására irányulnak, de foglalkoztunk humán synovia mintákkal, valamint humán eclampsia (terhességi toxæmia) kutatásával is, ez utóbbi kutatás eredményeként számos nemzetközi szabadalom került beadásra. Az idegrendszeri vizsgálataink kiterjedtek humán post mortem agyak vizsgálatára, de állatmodellek felhasználásával Alzheimer-kór, vaszkuláris demencia, depresszió, valamint alvás kutatására is. A vér és a teljes agyszövet vizsgálatán túl, metodikákat dolgoztunk ki különböző szubcelluláris alkotók, mint szinaptoszóma, mitokondrium, mitokondriumasszociált membrán (MAM), extracelluláris vezikulum frakcionálására. Számos más területet érintő kutatásunk mellett 29 publikációnk jelent meg a proteomika területén, a technika 2006-ban történt bevezetése óta.

Fontos megemlíteni, hogy kísérleti munkánkat segítik elektrofiziológiai és neurokémiai laboratóriumaink. Továbbá elsőként alkalmaztunk single cell RNS szekvenálást a hazai idegtudományban és komplex összefüggéseket tártunk fel a sejtek egyedi proteinszintézis rendszerében. Ezt a munkát egy speciális szelet patch-clamp laboratórium segíti 3 csatornás PCR berendezéssel kiegészítve.

### Elérhetőségek:

Laborvezető: *Dr. Kékesi Adrienna Katalin*  
✉ [kakekesi@ttk.elte.hu](mailto:kakekesi@ttk.elte.hu)

✉ 1117 Budapest, Pázmány Péter stny. 1/c. V. em.

## SZBK Proteomikai Laboratórium


A Szegedi Biológiai Kutatóközpontban működő Proteomikai Laboratórium 2000 óta szolgálja a magyar kutatóközösséget különböző tömegspektrometriás fehérjeanalitikai mérésekkel. Csoportunk mentora és első vezetője *Medzihradszky F. Katalin*, aki hatalmas tapasztalattal és nemzetközi elismertséggel rendelkezik. Ő indította útjára laborunkat, neki köszönhetjük szaktudásunk alapjait, jelenleg is rendszeres tanácsadónk.

Kutatócsoportunk nagy gyakorlattal rendelkezik különböző komplexitású fehérjemin-ták (gél-szeparált fehérjék; egyszerűbb fehérjekeverékek; testfolyadékok, szövetek vagy sejt-kultúrák) kvalitatív és kvantitatív jellemzésében. Bejáratott módszerünk van proteinkomp-lexek izolálására és bizonyos poszttranszlációs módosítások analízisére (foszforiláció, glikoziláció, ubikvitinálás, diszulfidhidak és proteolitikus hasítóhelyek meghatározása). Ki-sebb méretű fehérjéket intakt formában is analizálunk. Nagy tapasztalatunk van a különböző fragmentációs technikával felvett MS/MS spektrumok értelmezésében, ezért szükség esetén *de novo* szekvenálást is végzünk. Kiemelt kutatási területünk az extracelluláris, mucin típusú O-glikoziláció jellemzése különböző testnedvekben.

Projektjeink döntő többségében a fehérjéket (jellemzően) tripszines emésztést követő-en, peptidszinten analizáljuk adatfüggő LC-MS/MS analízissel. A relatív mennyiségi megha-tározásokat az adott projektre szabva MS1 (jelölésmentes kvantitálás) vagy MS2 (izobár jelölés [TMT] esetleg spektrumszámlálás) alapon egyaránt végezhetjük. A fehérjeazonosítások során többféle adatbázis-kereső szoftvert (Protein Prospector, Mascot, Byonic, Sequest) is használunk, a mennyiségi analíziseket a Proteome Discoverer és Skyline szoftvercsomagok segítik.

Műszerparkunkat, melyet a Magyar Molekuláris Medicina Kiválósági Központ Egysejtes Omikák Műszerközpontjával közösen üzemeltetünk, két modern, nagy felbontású és ér-zékenységű Orbitrap tömegspektrométer (Thermo Orbitrap Fusion Lumos Tribrid és Thermo Orbitrap Elite), több nanoHPLC (Evosep One, Thermo Ultimate3000 RSLC, Waters MClass és NanoAcquity) alkotja, és egy kisműszerekkel jól felszerelt mintaelőkészítő laboratórium egészíti ki.

### Elérhetőségek:

Laborvezető: dr. Darula Zsuzsanna tudományos főmunkatárs  
 darula.zsuzsanna@brc.hu

✉ Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Szeged 6726, Temesvári krt. 62.

### Laborban dolgozó munkatársak:

dr. Hunyadi-Gulyás Éva tudományos főmunkatárs  
 dr. Klement Éva tudományos munkatárs  
 dr. Pettkő-Szandtner Aladár tudományos munkatárs  
 dr. Pap Ádám tudományos munkatárs  
 Báloné Árva Ágnes labortechnikus

## Proteomika Szolgáltató Laboratórium, Debreceni Egyetem

A Proteomika Szolgáltató Laboratóriumot 2005-ben hozta létre a Debreceni Egyetem ÁOK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézete. A laboratórium proteomikai és metabolomikai szolgáltatásokat nyújt az egyetemi, klinikai kutatólaborok és ipari felhasználók számára, valamint elméleti és gyakorlati képzés formájában folyamatosan ismerteti a proteomikai technikákat a Debreceni Egyetem hallgatóival és kutatóival.

Laboratóriumunk elsődleges feladata a fehérjeanalitika. Különböző mintákból, többek között szövetmintákból, sejtekből, könnyből, verejtékből és nyálból, de vérmintából is azonosítunk fehérjét szolgáltató laborként a megrendelő kérésének megfelelően. A fehérjék vizsgálata mellett a laboratórium különböző metabolitok és kis molekulák LC-MS analízisére is lehetőséget biztosít.

A szolgáltatásként végzett vizsgálatokkal párhuzamosan a laboratóriumban több kutatás is folyik, javarészt különböző betegségekben szenvedő emberektől gyűjtött testfolyadék mintákból, mint például a könny, nyál, verejték és szérum. Korábbi vizsgálatok során diabéteszes retinopátiás és Alzheimer-kóros betegek könnymintáiban potenciális biomarker fehérjéket azonosítottunk, valamint vizsgáltuk szájjüregi daganatos betegek nyálmintáinak fehérjeprofilját is. Jelenleg proteomikai és metabolomikai vizsgálatokat végzünk elhízott és diabéteszes betegek szérum mintáin.

A kutatások során munkacsoportunk fókuszába az immunrendszer részét képező úgynevezett antimikrobiális és immunmodulátor peptidek/fehérjék (AMP-k) kerültek. Az AMP-k minden testfolyadékban megtalálhatók, ahol egy kémiai barriert alkotva védelmet biztosítanak a fertőzésekkel szemben. Több patológiás esetben bizonyítottuk, hogy a vizsgált testfolyadékok AMP-profiljában változás történt, így ezen fehérjék potenciális biomarkerekként is szolgálhatnak. Emellett az AMP-k vizsgálatával mélyebb betekintést nyerhetünk lokális és szisztémás betegségek patomechanizmusába, ezáltal ezen fehérjék potenciális terápiás célpontokként is szolgálhatnak.

A nagy mennyiségű adat generálása mellett fontos szempont az adatok elemzése és megfelelő interpretálása is. Kutatócsoportunk kidolgozott egy interakciós hálózatok elemzéséhez használható statisztikai eljárást, melynek segítségével komplexebb módon, rendszer szinten vizsgálhatók az egyes mintatípusok közötti különbségek.

Az LC-MS vizsgálatok mellett a laboratóriumban lehetőség van egy- és kétdimenziós gélelektroforetikus fehérje elválasztásra is. Kétdimenziós elválasztás segítségével teljes proteomok válnak összehasonlíthatóvá, majd az egyes mintatípusok között különbséget mutató fehérjék tömegspektrometriásan azonosíthatók.

A laboratóriumban használt műszerek:

- 5500 QTRAP (Sciex) tömegspektrométer kismolekulák, fehérjék azonosítására és SRM alapú kvantitálására TurboV ESI ionforrással
- Orbitrap Fusion (Thermo Scientific) tömegspektrométer ESI és nano ESI ionforrásokkal, ETD, HCD és CID ütközési lehetőségekkel fehérjék azonosítására és kvantitálására
- Thermo Easy nLC 1200 (Thermo) nano LC peptidek kromatográfiás elválasztásához
- Acquity H-class UPLC (Waters) PDA detektorral metabolitok kromatográfiás elválasztásához
- Transcend™II System with Multi-channel and TurboFlow™Technology (Thermo Scientific) online tömegspektrométerrel kapcsolható elválasztási rendszer a gyors, minta-előkészítés nélküli analízishez
- BioRad IEF cell 7 cm, 11 cm, 17 cm és 24 cm strip-ek izoelektromos fókuszálására

- BioRad Mini-PROTEAN Tetra Cell, BioRad PROTEAN II xi XL Cells, BioRad PROTEAN Plus Dodeca Cell elektroforézisre
- BioRad PROTEAN Plus Multi-Casting Chamber
- BioRad PharosFX Plus System géldokumentációra
- Sorvall WX Ultra (Thermo Scientific) ultracentrifuga

**Elérhetőségek:**

Dr. Csősz Éva, egyetemi tanár

✉ cseva@med.unideb.hu

Dr. Kalló Gergő, egyetemi adjunktus

✉ kallo.gergo@med.unideb.hu

✉ 4032 Debrecen, Nagyerdei krt. 98., Elméleti tömb 204.

**Laborban dolgozó munkatársak:**

Guba Andrea, PhD hallgató

Bertalan Petra, PhD hallgató

Mabuse Moagi, PhD hallgató

Erdenetsetseg Nokhoijav, PhD hallgató

Uladzislau Vadadokhau, PhD hallgató

Mashid Moballegh Naseri, PhD hallgató

Kökényesiné Csáki Julianna, technikus

Sólyom Kamilla, analitikus, technikus

Kovács Renáta, analitikus

**Természettudományi Kutatóközpont****MS Proteomika Kutatócsoport, MTA-TTK Lendület Glikán Biomarker Kutatócsoport**

A Természettudományi Kutatóközpontban működő MS Proteomika és Glikán Biomarker Kutatócsoportok fő célja különböző rosszindulatú daganatos megbetegedések, elsősorban tüdőrák és prosztatarák kialakulása és előrehaladása során lejátszódó változások felderítése fehérjék és különböző poszt-transzlációs módosulások (glikoziláció, foszforiláció) szintjén, valamint potenciális fehérje biomarkerek azonosítása. Ennek megvalósítása érdekében szoros együttműködésben állunk számos hazai és nemzetközi klinikával.

A biológiai vizsgálatok mellett aktívan foglalkozunk proteomikai és glikoproteomikai módszerek fejlesztésével, többek között ütközési energia optimalizálásával és különböző emésztőenzimek összehasonlításával. Célunk olyan munkafolyamatok kidolgozása, amelyek figyelembe veszik a minta tulajdonságait és a megválaszolandó biológiai kérdést, valamint a készülékeink és szoftvereink képességeit teljes mértékben kihasználják.

**Főbb műszerek**

- Bruker Maxis II tömegspektrométer Dionex UltiMate 3000 UPLC-vel kapcsolva
- Waters Q-TOF Premier tömegspektrométer nanoAcquity UPLC-vel kapcsolva

Főbb alkalmazott módszerek/technikák: Standardok és komplex biológiai minták (szövetek, testnedvek, testnedvekből izolált extracelluláris vezikulumok) átfogó proteomikai karakterizálását végezzük nanoUHPLC-ESI-MS/MS mérések segítségével, leggyakrabban bottom-up megközelítést, adatfüggő mérési technikát és jelölésmentes mennyiségi meghatározást alkalmazva. A széles körben tanulmányozott poszt-transzlációs módosulások mellett érdeklődésünk tárgyát képezi a proteoglikánok vizsgálata, ahol egyes meghatározott vázfehérjékhez glükózaminoglikán (GAG) láncok kapcsolódnak. A GAG-okat a fehérjékhez hasonlóan diszacharid egységekké emésztve, HPLC-ESI-MS/MS-sel vizsgáljuk. A proteomikai és glikomikai mérési eredmények kiértékelést a kereskedelembe kapható szoftverek (pl. Byonic, MaxQuant, Scaffold, MassLynx) mellett számos saját fejlesztésű szoftver (MassKinetics, GlycoPattern, Serac) is támogatja.

**Elérhetőségek:**

*Dr. Drahos László*, tudományos főmunkatárs  
(MS Proteomika Kutatócsoport)

✉ drahos.laszlo@ttk.hu

*Dr. Turiák Lilla*, tudományos főmunkatárs  
(MTA-TTK Lendület Glikán Biomarker Kutatócsoport)

✉ turiak.lilla@ttk.hu

✉ Természettudományi Kutatóközpont, 1117 Budapest, Magyar Tudósok krt. 2.

**Laborborokon dolgozó munkatársak:**

Dr. Révész Ágnes, tudományos munkatárs

Dr. Sugár Simon, tudományos munkatárs

Gömöry Ágnes, tudományos munkatárs

Nagy Kinga, PhD-hallgató

Szabó Dániel, PhD-hallgató

Bugyi Fanni, PhD-hallgató

Balbisi Mirjam, PhD-hallgató

Pál Domonkos, PhD-hallgató



## Proteomikai Laboratórium, Szegedi Tudományegyetem

1994-ben alakítottuk ki a Szegedi Orvostudományi Egyetem Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Intézetének Analitikai Laboratóriumát, melynek feladata kezdettől fogva aminosavak, peptidok és fehérjék elválasztástechnikán és tömegspektrometrián alapuló analízise volt. Ebből a háttérből nőtt ki 2004-ben a NeuroProteomikai Laboratórium, melynek kezdeti tudományos irányvonala a pszichiátriai és neurodegenerációs betegségek fehérjeszintű molekuláris hátterének vizsgálata volt. Saját kutatási területünkön végzett munkákon túl kooperáló partnereinkkel számtalan kvalitatív és kvantitatív proteomikai vizsgálatot végeztünk a legkülönbözőbb eredetű (*Streptomyces griseus* baktérium, *C. elegans* gyűrűsféreg, lucerna, búza, tritikálé, egér, patkány, liba, juh, marha, humán) biológiai mintából. Így vizsgáltuk különböző testfolyadékok (szérum, plazma, likvor és könny), fagyasztott, ill. paraffinba ágyazott szövetek (agy, szív, tüdő, máj, vese), legkülönbözőbb sejtenyészetek, sejtmembránok, exoszómák proteomjának összetételét. A minták nagy koncentrációjú fehérjeinek eltávolítására kivonási (deplécio), a kis koncentrációjú fehérjék izolálására különböző dúsítási módszereket alkalmazunk. Speciális fehérjék izolálására „pull-down” technikákat (avidin, antitest, peptid, DNS) is használunk.

A fehérjék azonosítását, minőségi és mennyiségi meghatározását folyadékkromatográffal kombinált tömegspektrométerrel (LC-MS) végezzük, melynek eredményeit különböző bioinformatikai és biostatistikai módszerrel értékeljük. Mintatípustól függően egy-egy mintában akár 4–5000 fehérjét is tudunk azonosítani, ill. azok relatív mennyiségét is meghatározuk. Az azonosított fehérjék koncentrációtartománya akár 5 nagyságrend is lehet. Relatív összehasonlító vizsgálatokkal meg tudjuk határozni két különböző állapotú minta (pl. kóros – normál, kezelt – kezeletlen stb.) proteomjának eltérését, változását. Stabil izotóppal jelzett standardok alkalmazásával célzott fehérjék „abszolút” mennyiségének meghatározása is módszereink közé tartozik. Vizsgáltuk különböző poszt-transzlációs módosított (foszforilált, glikozilált stb.) fehérjék minőségi és mennyiségi viszonyait is.

A laboratórium műszerparkja fokozatosan fejlődött, s mára rendelkezünk az expressziós proteomika magas szintű műveléséhez szükséges felszereltséggel. Fehérjék nagyhatékonyságú elválasztását 1D-, ill. 2D-PAGE elektroforézissel (BioRad, Hoefer), ill. folyadékkromatográfiával (Agilent, Waters) végezzük. A fehérjék azonosítására az ún. „bottom-up” proteomikai módszeret használjuk, ami a minta fehérjeinek enzimatis bontásából származó peptidok ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (UHPLC) elválasztásán és on-line tandem tömegspektrometriás analízisen (MS/MS) alapul. A kromatográfiás elválasztásokat nanoAcquity és M-Class Acquity készülékeken (Waters) végezzük. A QTOF Premier (Waters), Q-Exactive Plus Orbitrap (Thermo) és a legújabb Exploris 240 Orbitrap (Thermo) tömegspektrométereink lehetővé teszik fehérjék nagy sorozatban történő, nagy pontosságú és érzékenységgű, átfogó és célzott minőségi és mennyiségi vizsgálatát.

A mérési eredmények bioinformatikai és biostatistikai kiértékelésére és értelmezésére a MASCOT, Skyline, MaxQuant, DIA-NN, Encyclopedia, SearchGUI, FragPipe, Perseus, InstantClue és egyéb R- és Python programokat használunk.

**Elérhetőségek:**

Laborvezető: *Dr. Szabó Zoltán*, egyetemi adjunktus  
✉ [szabo.zoltan@med.u-szeged.hu](mailto:szabo.zoltan@med.u-szeged.hu)

✉ Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar,  
Orvosi Vegytani Intézet, 6720 Szeged, Dóm tér 8.

**Laborban dolgozó munkatársak:**

*Prof. Dr. Janáky Tamás*, professor emeritus, a Laboratórium létrehozója

✉ [janaky.tamas@med.u-szeged.hu](mailto:janaky.tamas@med.u-szeged.hu)

*Dr. Kecskeméti Gábor*, tanársegéd

✉ [kecskemeti.gabor@med.u-szeged.hu](mailto:kecskemeti.gabor@med.u-szeged.hu)

*Dr. Kele Zoltán*, egyetemi docens

✉ [kele.zoltan@med.u-szeged.hu](mailto:kele.zoltan@med.u-szeged.hu)

*Dr. Ábrahámné Szendrei Rita*, technikus

## 19. GYAKRAN ISMÉTELT KÉRDÉSEK

A proteomika szolgáltató laboratóriumokban dolgozók gyakran szembesülnek bizonyos kérdésekkel a felhasználók részéről a mintát, az analízist vagy az adatelemzést illetően. Az alábbiakban összegyűjtöttük azokat a gyakran ismételt kérdéseket (és a rájuk adott válaszokat), amelyek segíthetnek a kísérletek tervezésében, a munkafolyamat kritikus végiggondolásában és az adatok értelmezésében.

A kérdések és válaszok olvasása, nem biztos, hogy minden esetben tudja a szükséges információt biztosítani, ezért mindenképp érdemes konzultálni a proteomika szolgáltató laboratóriumok munkatársaival, lehetőség szerint már a kísérlet megtervezése előtt. Továbbá érdemes statisztikus segítségét is kérni, még a kísérlettervezés fázisában. Ugyanakkor fontos kiemelni, hogy humán minták esetében etikai engedély szükséges a vizsgálatok kivitelezéséhez, amelynek beszerzése minden esetben a megrendelő feladata.

Természetesen, az alábbi kérdések „csak” szemelvények, a teljesség igénye nélkül. Ha bővebb információra van szükség egy adott kérdéssel kapcsolatban, vagy további kérdések merülnek fel, a szerzők minden kedves olvasót arra bátorítanak, hogy keressék meg valamelyik hazai szolgáltató laboratórium munkatársait (elérhetőségek a [➔ 18. fejezetben](#)), és kérjék a segítségüket a mintára specifikus, optimális módszerek és lépések kiválasztásában, a kísérletek megtervezésében.

### Milyen típusú mintából lehet proteomikai analízist végezni?

**Válasz:** A legtöbb biológiai minta alkalmas proteomikai elemzésekre. Célszerű konzultálni a proteomika labor munkatársaival, hogy az adott minta milyen feltételek mellett lehet alkalmas a vizsgálatokhoz.

### Mekkora fehérjemennyiségre van szükség egy proteomikai vizsgálathoz?

**Válasz:** A rendelkezésre álló tömegspektrométer típusától függ, de általánosságban néhány mikrogramm elegendő. Pontosabban fogalmazva: jó ha néhány pikomólt tudunk injektálni minden komponensből. Talán így számolhatunk: tegyük fel, hogy van 50 mikrogramm fehérjénk (itt fontos figyelembe venni, hogy a fehérjekoncentráció-mérések sokszor túlbecsülik a fehérjemennyiséget), ez egyetlen 50 kDa molekulasúlyú fehérjére 1 nanomól. Ha 100 ilyen fehérje egyenletesen oszlik el a mintában, akkor mindegyikre már csak 10 pikomól jut.

### Mikorra várható eredmény a mintáimból?

**Válasz:** A laboratóriumok terheltségétől függően napokon-heteken belül várható eredmény abban az esetben, ha semmi probléma nem adódik az LC-MS mérések során (pl. a minta dugulást okoz).

### Milyen formában küldhetem el a mintákat tömegspektrometriás elemzésre?

**Válasz:** A minta típusától, fajtájától és az analízis módjától függően a minta lehet oldatban, gélbe futtatva vagy akár szilárd formában is (pl. MALDI mérés esetén).

**Milyen részletességgel szükséges ismertetnem a mintám előéletét?**

**Válasz:** Minél többet tudunk arról, hogyan lett az adott minta kezelve, annál inkább az adott mintára optimális minta-előkészítési protokollal tudunk dolgozni, így minden elsőre talán elhanyagolható információ is nagy jelentőséggel bír. A mintával érintkező vegyületek reagálhatnak egyes aminosavak oldalláncával vagy valamelyik terminussal; az esetleges szennyező fehérjék (médiumból, enzimpreparátumból, vagy pl. gazdafehérjék) éppen úgy detektálhatók, mint a minta valós tartalma. Ha ezt nem vesszük figyelembe, pl. nem számolunk a médium marhaszérum-tartalmával, és csak a sejtenyészet humán fehérjéire keresünk, az így kapott eredmények helytelen következtetésekre vezethetnek.

**Milyen gélből/foltból lehetséges elvégezni a fehérje azonosítást?**

**Válasz:** Az alkalmazott festék típusától függ. Coomassie-festék esetében a szemmel látható sávokból nagy biztonsággal lehetséges a fehérje azonosítása. Fluoreszcens festékek esetében a festék érzékenységtől függ, de a legtöbb esetben ezekből a mintákból is nagy valószínűséggel sikerül kimutatni a fehérjéket. Ezüsfestés esetén a halványabb sávokból viszont valószínűleg csak kevés peptidet/fehérjét sikerül azonosítani. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy egy sáv többnyire nem egyetlen fehérjét tartalmaz; illetve, hogy a Coomassie-festés legalább szemikvantitatív, míg az ezüsfestés egyáltalán nem. Ha valóban tudni szeretnénk, mi van egy fehérjeelegyenben, célszerű nem a kivágott sávot analizálni, hanem a gél egyenlő darabokra vágva vizsgálni a fehérjék eloszlását. A bennünket érdeklő fehérje nem feltétlenül ott jelenik meg, ahol várjuk – pl. lehet kisebb (processzáldott), lehet nagyobb (glikozilált), vagy előfordulhat, hogy túlterheltük a gél, és emiatt több sávban is megtalálható.

**Milyen minta-előkészítési lépéseket célszerű elvégezni a mintaküldés előtt?**

**Válasz:** Mintaküldés előtt minden esetben érdemes konzultálni a proteomikai laboratórium munkatársaival, akik az adott mintára specifikus tanácsokat tudnak adni. Mindezek mellett néhány fontos apróság a **→ 3. fejezetben** ismertetett minta-előkészítési lépéseken túl.

- Ha nem tudunk megfelelő keratinmentes környezetet biztosítani, célszerű a minta-előkészítési lépéseket a proteomika labor munkatársaira hagyni.
- Coomassie-val festett gélek esetén fontos a háttér minél alaposabb eltávolítása a gélek megfelelő ideig történő mosásával, viszont nem célszerű metanollal mosni, mert megszterezheti az oldalláncokat.
- A géleket minden esetben lefedve vigyük el a proteomika laborba.
- Testfolyadékok (szérum, plazma, likvor, könny, nyál, verejték stb.) esetén fontos a megfelelő hűtés, akár jégen, akár szárazjégen, a minta típusától függően.
- Sejt- vagy szövettelizátumok esetén célszerű a centrifugálás utáni tiszta felülúszót eljuttatni a proteomika laborba.

**Hány szignifikáns különbséget mutató fehérjére számíthatok?**

**Válasz:** Sajnos, még a legjobban felszerelt proteomika laboratóriumok sem tudják előre megjósolni, hogy milyen eredményt hoz a tömegspektrometriás analízis, így pontos számokkal soha nem tudunk előre szolgálni.

### Miért nem látom az azonosított fehérjék listájában azt a fehérjét, ami engem főként érdekelne?

**Válasz:** Könnyen lehet, hogy fehérjénk szerepel a listán. Az azonosításhoz használt adatbázistól függően a fehérjék különböző fehérjeazonosítókkal, génnevekkel szerepelhetnek a listában. Célszerű ellenőrizni, hogy az adott adatbázisban szerepel-e a keresett fehérje és milyen azonosítóval. Az egyes szoftverek különbözőképpen kezelik, és adják meg a szekvencia hasonlósága miatt nem megkülönböztethető fehérjéket a találati listában, előfordulhat, hogy a keresett fehérje nem a program által elsődlegesenként kiemelt találatok között szerepel.

Előfordulhat azonban, hogy valóban nem sikerült a keresett fehérjét detektálni – ennek több oka is lehet:

- i) relatíve kevés van belőle az elegyben és „elvész a szénakazalban”,
- ii) van belőle elég, de túl rövid vagy túl nagy peptideket produkál az emésztés során; vagy egyáltalán nem emésztődik; vagy a peptidjei gyenge jelet adnak, esetleg rosszul fragmentálódnak stb.

Ilyenkor segíthet, ha tudjuk, mit keresünk – mert pl. lehet, hogy célszerű fehérjeszinten frakcionálni az elegyet, vagy más emésztő enzimet kell alkalmazni, stb.

### Ha Western blot-on látszik a keresett fehérje, miért nem szerepel a találatok között?

**Válasz:** Több ok is lehetséges. A Western blot (WB) során az antitestek használata miatt egy nagy jelerősítő rendszert építünk fel a membránon, emiatt a WB kimutatási határa sokszor jobb, mint egy klasszikus tömegspektrometriás analízisé. Éppen ezért előfordulhat, hogy bár WB-n szépen látszik a sáv, a mintában lévő fehérje mennyisége kevesebb a tömegspektrométer kimutatási határánál.

Egy másik lehetőség, hogy egy shotgun analízis során a fehérjéből származó peptidek nem kerültek kiválasztásra. Az esetleges egyéb okokat fentebb már említettük. Céltzott MS-vizsgálat esetében jobb eséllyel kimutatható a keresett fehérje. Egy másik lehetőség, hogy az antitest valójában nemcsak a keresett fehérjére specifikus és aspecifikus sávot látunk a bloton, a keresett fehérje nincs is jelen a mintában.

### Melyik a jobb módszer: az ELISA/Western blot vagy a tömegspektrometriás fehérjeazonosítás?

**Válasz:** Mindegyik módszernek vannak előnyei és hátrányai. Ha az általunk vizsgálni kívánt fehérjére elérhető specifikus (!) antitestek, akkor egyszerűbb egy ELISA/WB kísérletet végezni. Ha viszont az általunk keresett fehérjére nem áll rendelkezésre kereskedelmi forgalomban kapható antitest, vagy egyszerre több (>4) fehérje vizsgálatát szeretnénk elvégezni, akkor a tömegspektrometriás fehérjeazonosítást célszerű választanunk.

Amennyiben több peptidet azonosítunk, az MS egyértelműbb lehet, még akkor is, ha bizonyos módosítást vagy mutációt keresünk. Az antitest alapú azonosításokat viszont nem zavarják a többi fehérjék, amelyek ha nagy feleslegben vannak jelen, elfedhetik a célfehérjénket egy shotgun analízis során.

### Ismeretlen fehérje vizsgálata esetén milyen analízist célszerű végezni?

**Válasz:** Ha nincs információnk a mintánkban lévő fehérjé(k)ről, akkor egy shotgun vizsgálatot célszerű végezni, és az első lekeresést fajra szűkítés nélkül célszerű elvégezni. További részleteket a ➔6. és ➔7. fejezetekben olvashatnak.

**Ismert fehérje mennyiségének vizsgálata esetén milyen analízist célszerű végezni?**

**Válasz:** Ha elérhető a vizsgálandó fehérjére specifikus antitest, akkor célszerű ELISA/Western blot analízist végezni. Ha nincs megfelelő antitest, akkor célzott tömegspektrometriás elemzéssel vizsgálható a célfehérje. Amennyiben kvantitatív információ szükséges a fehérjéről, további információ a ➔ **8. fejezetben** olvasható.

**Több fehérje (5-20) kvantitatív vizsgálata esetén milyen analízist célszerű végezni?**

**Válasz:** A multiplex jellege miatt célszerű egy célzott tömegspektrometriás vizsgálatot (SRM/MRM vagy PRM) végezni, mivel így egy mintából szimultán tudjuk az összes keresett fehérjét vizsgálni. További információ a ➔ **8. fejezetben** található.

**Hogyan tudom egy adott fehérje poszttranszlációs módosítását megvizsgálni?**

**Válasz:** PTM-ek vizsgálatára több módszer is létezik. A legegyszerűbb, ha tisztított fehérje emésztési elegyét analizáljuk adatfüggő LC-MS/MS módszerrel, és miután meggyőződünk róla, hogy az adott fehérje jó lefedettséggel valóban jelen van a mintában, az adatok lekeresése során különböző PTM-eket is megengedünk. Ezt úgyis megtehetjük, hogy tetszőleges módosítást engedélyezünk választott vagy az összes aminosavon és a tömegváltozások gyakoriságából, és adott aminosav(ak)hoz kötődéséből következtethetünk arra, milyen PTM-ek vannak jelen. Intakt fehérjék tömegmérésével is nyerhetünk információt PTM-ek jelenlétéről, emellett több speciális tömegspektrometriás technikát is használhatunk a rendelkezésre álló készüléktől függően. Elérhetők PTM-specifikus festékek, valamint antitestek is, így ezekkel is megkísérlelhetjük igazolni a PTM jelenlétét.

**Hogyan tudok poszttranszlációs módosított proteomot vizsgálni?**

**Válasz:** Egy 2D elektroforézissel szeparált proteom esetében használhatunk PTM-specifikus festékeket, így például csak a foszforilált fehérjéről szerezhetünk információt. Klasszikus tömegspektrometriás vizsgálatok során szinte nélkülözhetetlen az adott PTM-et tartalmazó peptidek specifikus dúsítása, mivel dúsítás nélkül főként a módosítatlan peptidek kerülnének kiválasztásra és fragmentálásra. Ebből következik, hogy a PTM-ek vizsgálata mindig valamilyen mértékig célzott, a kiválasztott PTM-re optimalizált módon kell a minta-előkészítésnek, LC-MS mérésnek és adatelemzésnek történnie. További információ a ➔ **9., 10., 11. és 12. fejezetekben** olvasható.

**Milyen mértékű mennyiségi változások mutathatók ki shotgun proteomikai kísérletekben?**

**Válasz:** A hagyományos gélelektroforézis alapú kvantálás során általában minimum kétszeres ( $>2\times$ ,  $<0,5\times$ ) változást követeltek meg. Ezeket a határokat gyakran alkalmazzák shotgun LC-MS alapú mennyiségi mérés esetén is. Ezek a határok azonban viszonylag önkényesek, statisztikailag nem mindig indokoltak. Léteznek statisztikai módszerek a szignifikánsnak elfogadható minimális változások becslésére az adott kísérletben tapasztalt varianciák alapján. Fontos megjegyezni, hogy a variancia azonban fehérjénként is változik, nemcsak a kísérleti körülmények függvénye, és ezek a módszerek, csak megfelelően nagy mintaszám esetén adnak megbízható becslést. *In vivo* kísérletek esetén általában nagyobb biológiai variancia várható, mint *in vitro* esetben, így ha hasonló mértékű változásokat szeretnénk kimutatni, nagyobb mintaszám szükséges.

**Biológiai minták vizsgálatakor inkább genomikai vagy proteomikai analízist célszerű végezni?**

**Válasz:** A proteomikai és a genomikai analízisek ugyanannak a mintának a különböző aspektusairól adnak információt. Ha van rá lehetőség, érdemes mindkettőt elvégezni, mert egymást kiegészítő információkat kapunk és jobban ráláthatunk a biológiai rendszerek komplex működésére és jobban megérthetjük a betegségek mögött húzódó patobiokémiai folyamatokat. Azonban, ha választani szükséges, akkor a megválaszolandó biológiai kérdést kell mindig szem előtt tartani. Amennyiben a működés, a dinamikus változás megértése a cél, a proteomika az effektorok, a tényleges változást előidéző elemek vizsgálata révén részletgazdagabb információt tud nyújtani a fehérjék poszttranszlációs változásairól, a lokalizációjukról és annak változásairól, a mennyiségi viszonyokról, illetve a fehérje-fehérje interakciókról, mint a genomikai vizsgálatok, amelyek elől ezek a finom, ám annál fontosabb részletek rejtve maradnak.