Vérplazma fehérjék glikozilációjának vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Tóth Eszter

Semmelweis Egyetem Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Vékey Károly DSc, osztályvezető

Hivatalos bírálók: Dalmadiné dr. Kiss Borbála PhD, tudományos munkatárs Dr. Takátsy Anikó PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás DSc, egyetemi tanár Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szökő Éva DSc, egyetemi tanár Dr. Lelik László CSc, egyetemi docens

Budapest 2016

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	
1. Bevezetés	
1.1. A proteomika	
1.2. A glikoziláció	11
1.2.1. A glikoproteinek típusai	
1.2.2. Az N-glikoproteinek szintézise és típusai	
1.3. Proteomikában alkalmazott elválasztástechnikai módszerek	15
1.3.1. A proteomika és a glikoproteomika vizsgáló módszerei	15
1.3.2. A fehérjék elválasztására alkalmazott módszerek	
1.3.3. A glikoproteinek elválasztására alkalmazott módszerek	
1.3.3.1. Dúsítás	
1.3.3.2. Izolálás	19
1.3.3.3. Kromatográfiás frakcionálás	19
1.4. A tömegspektrometrián alapuló proteomika	
1.4.1. A tömegspektrometria	
1.4.1.1. Az ESI ionizáció	
1.4.1.2. A QTOF készülék	
1.4.2. A HPLC-MS kapcsolás	
1.4.2.1. A HPLC-ESI-MS kapcsolás hosszú távú stabilitása	
1.4.3. A tömegspektrometrián alapuló proteomika módszerei	
1.4.3.1. Fragmentációs módszerek	30
1.4.4. Glikozilációs mintázatok meghatározása tömegspektrometriával	
1.5. Ionizáló sugárzás és glikoziláció	35
2. Célkitűzések	
3. Módszerek	40
3.1. Anyagok és minták	40
3.2. Eszközök és készülékek	40
3.3. Depletálás	41
3.4. Frakcionálás	42
3.5. Enzimatikus hasítás	
3.6. Nano-HPLC-MS(/MS) analízis	
3.7. Kiértékelés	45
3.7.1. A fehérjék azonosítása	45
3.7.2. A helyspecifikus glikozilációs mintázatok meghatározása	

3.7.2.1. Fehérjék glikozilációs helyeinek és nagyobb intenzitású glikoformjain azonosítása	nak . 45
3.7.2.2. A kisebb intenzitású glikoformok azonosítása	. 47
3.7.2.3. Glikozilációs mintázatok meghatározása GlycoPattern szoftverrel	. 47
4. Eredmények	. 50
4.1. A helyspecifikus glikozilációs mintázatok meghatározásának folyamata és az elvégzett glikoproteomikai vizsgálatok	. 50
4.2. Az albumin és immunglobulin G fehérjék depletálása	. 52
4.3. Vérplazma fehérjék frakcionálása	. 52
4.3.1. A kromatográfiás módszer	. 53
4.3.2. Különböző fehérjék frakcionálásának vizsgálata	. 55
4.3.2.1. A transzferrin vizsgálata	. 56
4.3.2.2. Az alfa-1-savas glikoprotein vizsgálata	. 57
4.3.2.3. A haptoglobin glikozilációjának vizsgálata	. 58
4.3.3. Glikozilációs mintázatok torzításának vizsgálata	. 58
4.4. A fehérjék enzimatikus hasítása	. 59
4.5. A vérplazma frakciókban azonosított fehérjék	. 59
4.6. A meghatározott helyspecifikus glikozilációs mintázatok	. 63
4.7. A HPLC-MS méréssorozatok reprodukálhatósága és korrekciója	. 67
4.8. Glikoform intenzitások változása sugárkezelést követően	. 70
4.8.1. Egy adott beteg mintáinak vizsgálata	. 73
4.8.2. Az összes beteg mintáinak vizsgálata	. 75
5. Megbeszélés	. 77
5.1. Depletálás értékelése	. 77
5.2. Vérplazma frakcionálása fordított fázisú kromatográfiával	. 78
5.2.1. Glikoproteinek és egyéb fehérje variánsok fordított fázisú frakcionálása	. 79
5.2.2. A glikozilációs mintázatok torzítatlansága	. 82
5.2.3. Frakcionálás hatása a glikozilációs mintázatok minőségére	. 83
5.2.3.1. A glikozilációs mintázatok minőségének jellemzése	. 83
5.2.3.2. Haptoglobin glikozilációs mintázatának meghatározása frakcionáláss és frakcionálás nélkül	al . 84
5.2.4. A frakcionálási módszer értékelése	. 86
5.3. Vérplazma fehérjék helyspecifikus glikozilációs mintázatának meghatározása a mintázatok jelentősége	és . 86
5.3.1. A vérplazma fehérjék glikozilációs mintázatának meghatározására alkalmazott módszer	. 87

5.3.2. Az alkalmazott módszer részletes értékelése a ceruloplazmin példáján bemutatva	38
5.3.3. A haptoglobin különböző laboratóriumokban meghatározott helyspecifikus glikozilációs mintázata	90
5.3.4. A meghatározott helyspecifikus glikozilációs mintázatok részletessége és jelentőségük) 3
5.4. A HPLC-MS méréssorozatok polinomiális korrekciója9) 3
5.5. Ionizáló sugárzás hatása a plazma fehérjék glikozilációs mintázatára) 5
5.5.1. Az adatok normálásának jelentősége 9) 5
5.5.2. Egér és ember minták összehasonlítása) 8
6. Következtetések)0
7. Összefoglalás 10)2
8. Summary)3
9. Irodalomjegyzék 10)4
10. Saját publikációk jegyzéke 12	26
11. Köszönetnyilvánítás 12	28

Rövidítések jegyzéke

CID	ütközés indukált disszociáció (collison induced dissociation)
con A	konkanavalin A (concanavalin A)
Da	dalton (dalton)
DDA	adatfüggő analízis (data dependent analysis)
DNS	dezoxiribonukleinsav (deoxyribonucleic acid)
dre	kiterjesztett dinamikus tartományú mérés
	(dynamic range enhancement)
DTT	1,4-ditio-treitol (1,4-dithiothreitol)
ECD	elektron befogásos disszociáció
	(electron capture dissociation)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav (ethylenediaminetetraacetic acid)
EI	elektron(ütközéses) ionizáció (electron ionization)
ER	endoplazmás retikulum (endoplasmic reticulum)
ESI	elektroporlasztásos ionizáció (electrospray ionization)
ETD	elektron transzfer disszociáció (electron transfer dissociation)
ETFE	etilén-tetrafluor-etilén (ethylene tetrafluoroethylene)
FDA	Egyesült Államok Élelmezési és Gyógyszerügyi Hivatala
	(Food and Drug Administration)
FEP	fluorozott etilén-propilén (fluorinated ethylene propylene)
FT-ICR	Fourier transzformációs ion ciklotron rezonancia analizátor
	(Fourier transform ion cyclotron resonance analyzer)
GC	gázkromatográfia (gas chromatography)
Gy	gray (gray)
HILIC	hidrofil kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfia
	(hydrophilic interaction liquid chromatography)
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
	(high performance liquid chromatography)
LC	folyadékkromatográfia (liquid chromatography)
m/z	tömeg/töltés (mass-to-charge)

MALDI	mátrix segített lézer deszorpció/ionizáció
	(matrix-assisted laser desorption/ionization)
mRNS	hírvivő ribonukleinsav (messenger ribonucleic acid)
MS	tömegspektrometria (mass spectrometry)
MS/MS	tandem tömegspektrometria (tandem mass spectrometry)
nano-ESI	nl/perc nagyságrendű áramlási sebességre optimált
	elektrospray ionizáció (nano-electrospray ionization)
nano-HPLC	nanoáramlásos nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
	(nanoflow high performance liquid chromatography)
ORM	orozomukoid, alfa-1-savas glikoprotein
	(orosomucoid, alpha-1-acid glycoprotein)
pI	izoelektromos pont (isoelectric point)
PMF	peptid tömeg ujjlenyomat (peptide mass fingerprinting)
PNGase F	peptid N-glikozidáz F (peptide -N-glycosidase F)
Q	kvadrupól analizátor (quadrupole analyzer)
QC	minőségellenőrző minta (quality control)
QTOF	kvadrupól és repülési idő analizátor
	(quadrupole and time-of-flight analyzer)
RF	rádiófrekvenciás feszültség (radio frequency)
RP-HPLC	fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
	(reversed phase high performance liquid chromatography)
SD	standard deviáció (standard deviation)
RSD	relatív standard deviáció (relative standard deviation)
TOF	repülési idő analizátor (time-of-flight analyzer)
UDP	uridin-difoszfát (uridine diphosphate)
UPLC	ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
	(ultra performance liquid chromatography)
UV	ultraibolya sugárzás (ultraviolet radiation)
WGA	búzacsíra agglutinin (wheat germ agglutinin)

A dolgozatban előforduló aminosavak:

Arg	arginin (arginine)
Asn	aszparagin (asparagine)
Asp	aszparaginsav (aspartic acid)
Lys	lizin (lysine)
Met	metionin (methionine)
Pro	prolin (proline)
Ser	szerin (serine)
Thr	treonin (threonine)
Trp	triptofán (tryptophan)
Tyr	tirozin (tyrosine)

A dolgozatban előforduló fehérjék Uniprot azonosítói:

A1AG1_HUMAN	alfa-1-savas glikoprotein 1 (alpha-1-acid glycoprotein 1)
A1AG2_HUMAN	alfa-1-savas glikoprotein 2 (alpha-1-acid glycoprotein 2)
A1AT_HUMAN	alfa-1-antitripszin (alpha-1-antitrypsin)
A1BG_HUMAN	alfa-1B-glikoprotein (alpha-1B-glycoprotein)
A2GL_HUMAN	leucinban gazdag alfa-2-glikoprotein
	(leucine-rich alpha-2-glycoprotein)
A2MG_HUMAN	alfa-2-makroglobulin (alpha-2-macroglobulin)
AACT_HUMAN	alfa-1-antikimotripszin (alpha-1-antichymotrypsin)
AFAM_HUMAN	afamin (afamin)
ALBU_HUMAN	szérum albumin (serum albumin)
ALS_HUMAN	inzulinszerű növekedési faktor-kötő fehérje komplex
	labilis savas alegység (insulin-like growth factor-binding
	protein complex acid labile subunit)
AMBP_HUMAN	AMBP fehérje (protein AMBP)
ANT3_HUMAN	antitrombin-III (antithrombin-III)
APOA1_HUMAN	apolipoprotein A-I (apolipoprotein A-I)
APOA2_HUMAN	apolipoprotein A-II (apolipoprotein A-II)
APOA4_HUMAN	apolipoprotein A-IV (apolipoprotein A-IV)
APOB_HUMAN	apolipoprotein B-100 (apolipoprotein B-100)

APOH_HUMAN	béta-2-glikoprotein 1 (beta-2-glycoprotein 1)
ATRN_HUMAN	attraktin (attractin)
C1QA_HUMAN	komplement C1q alkomponens A alegység
	(complement C1q subcomponent subunit A)
C1R_HUMAN	komplement C1r alkomponens
	(complement C1r subcomponent)
C1S_HUMAN	komplement C1s alkomponens
	(complement C1s subcomponent)
C4BPA_HUMAN	C4b-kötő fehérje alfa lánc (C4b-binding protein alpha chain)
CERU_HUMAN	ceruloplazmin (ceruloplasmin)
CFAB_HUMAN	komplement faktor B (complement factor B)
CFAH_HUMAN	komplement faktor H (complement factor H)
CFAI_HUMAN	komplement faktor I (complement factor I)
CLUS_HUMAN	kluszterin (clusterin)
CO3_HUMAN	komplement C3 (complement C3)
CO4A_HUMAN	komplement C4-A (complement C4-A)
CO4B_HUMAN	komplement C4-B (complement C4-B)
CO6_HUMAN	komplement komponens C6 (complement component C6)
CO7_HUMAN	komplement komponens C7 (complement component C7)
CO8G_HUMAN	komplement komponens C8 gamma lánc
	(complement component C8 gamma chain)
CO9_HUMAN	komplement komponens C9 (complement component C9)
CPN2_HUMAN	karboxipeptidáz N 2-es alegység
	(carboxypeptidase N subunit 2)
ECM1_HUMAN	extracelluláris mátrix fehérje 1
	(extracellular matrix protein 1)
F13B_HUMAN	koagulációs faktor XIII B lánc
	(coagulation factor XIII B chain)
FETUA_HUMAN	alfa-2-HS-glikoprotein (alpha-2-HS-glycoprotein)
FHR1_HUMAN	komplement faktor H-hoz tartozó fehérje 1
	(complement factor H-related protein 1)
FINC_HUMAN	fibronektin (fibronectin)

GELS_HUMAN	gelzolin (gelsolin)
HBB_HUMAN	hemoglobin béta alegység (hemoglobin subunit beta)
HEMO_HUMAN	hemopexin (hemopexin)
HEP2_HUMAN	heparin kofaktor 2 (heparin cofactor 2)
HPT_HUMAN	haptoglobin (haptoglobin)
HPTR_HUMAN	haptoglobinhoz tartozó fehérje (haptoglobin-related protein)
HRG_HUMAN	hisztidinben gazdag glikoprotein (histidine-rich glycoprotein)
IC1_HUMAN	plazma proteáz C1 inhibítor (plasma protease C1 inhibitor)
IGHA1_HUMAN	immunglobulin alfa-1 lánc C régió
	(Ig alpha-1 chain C region)
IGHA2_HUMAN	immunglobulin alfa-2 lánc C régió
	(Ig alpha-2 chain C region)
IGHD_HUMAN	immunglobulin delta lánc C régió
	(Ig delta chain C region)
IGHG3_HUMAN	immunglobulin gamma-3 lánc C régió
	(Ig gamma-3 chain C region)
IGHM_HUMAN	immunglobulin µ lánc C régió
	(Ig mu chain C region)
IGKC_HUMAN	immunglobulin kappa lánc C régió
	(Ig kappa chain C region)
ITIH1_HUMAN	inter-alfa-tripszin inhibítor nehéz lánc H1
	(inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1)
ITIH2_HUMAN	inter-alfa-tripszin inhibítor nehéz lánc H2
	(inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2)
ITIH4_HUMAN	inter-alfa-tripszin inhibítor nehéz lánc H4
	(inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4)
KLKB1_HUMAN	plazma kallikrein (plasma kallikrein)
KNG1_HUMAN	kininogén-1 (kininogen-1)
KV302_HUMAN	immunglobulin kappa lánc V-III régió SIE
	(Ig kappa chain V-III region SIE)
LAC1_HUMAN	immunglobulin lambda-1 lánc C régió
	(Ig lambda-1 chain C regions)

LAC2_HUMAN	immunglobulin lambda-2 lánc C régió
	(Ig lambda-2 chain C regions)
LAC7_HUMAN	immunglobulin lambda-7 lánc C régió
	(Ig lambda-7 chain C region)
LUM_HUMAN	lumikán (lumican)
PLMN_HUMAN	plazminogén (plasminogen)
PON1_HUMAN	szérum paraoxonáz/arilészteráz 1
	(serum paraoxonase/arylesterase 1)
PROS_HUMAN	vitamin K-függő fehérje S (vitamin K-dependent protein S)
STT3A_HUMAN	dolikol-difoszfo-oligoszacharid-fehérje glikoziltranszferáz
	STT3A alegység (dolichyl-diphosphooligosaccharide-
	protein glycosyltransferase subunit STT3A)
STT3B_HUMAN	dolikol-difoszfo-oligoszacharid-fehérje glikoziltranszferáz
	STT3B alegység (dolichyl-diphosphooligosaccharide-
	protein glycosyltransferase subunit STT3B)
THRB_HUMAN	protrombin (prothrombin)
TRFE_HUMAN	transzferrin (serotransferrin)
VTDB_HUMAN	vitamin D-kötő fehérje (vitamin D-binding protein)
VTNC_HUMAN	vitronektin (vitronectin)
ZA2G_HUMAN	cink-alfa-2-glikoprotein (zinc-alpha-2-glycoprotein)

1. Bevezetés

1.1. A proteomika

A proteomika a fehérjék szerkezetének és funkcióinak megismerésével foglalkozó tudományterület. A proteom [1, 2] a szervezet teljes fehérjeállományát jelenti, ennek együttes vizsgálata a proteomika feladata. A proteomika tárgykörébe tartozik többek között a fehérjék egymással és környezetükkel való kölcsönhatásainak felderítése (szénhidrátokkal, lipidekkel, nukleinsavakkal, gyógyszerekkel), a fehérjék módosulatainak vizsgálata, az egyes fehérjék lokalizációjának meghatározása, a különböző élettani és patológiai folyamatok mechanizmusának megismerése, valamint betegségek esetében biomarkerek keresése. [3-5]

A proteomika viszonylag új tudományterület, az első vizsgálatok a kétdimenziós gélek 1970-es évekbeli bevezetéséhez köthetők [6-8], a proteomika szó viszont csak 1995-ből származik [9, 10]. A genomika óriási sikerét, az emberi génállomány feltérképezését követően fordult a kutatók figyelme a fehérjék irányába. A fehérjék száma – főként a poszt-transzlációs módosítások következtében – sokkal nagyobb, mint az azokat kódoló géneké, és a génekkel ellentétben a fehérjék folyamatos változásokon mennek keresztül. Ezenkívül a fehérjék nem amplifikálhatók, ami nagy vizsgálati minta mennyiség használatát teszi szükségessé. Összességében a fehérjék vizsgálata sokkal nehézkesebb és bonyolultabb, több tudományterület: a biokémia, molekuláris biológia, analitikai kémia és a bioinformatika szoros együttműködését és folyamatos fejlesztését igényli. Ugyanakkor a sokféleségnek, valamint az állandó koncentrációbeli és különböző módosítások által okozott változásoknak köszönhetően a fehérjék vizsgálata sokkal részletesebb információt szolgáltathat a sejtek, szövetek, vagy akár egész szervezetek működéséről, és a környezetük megváltozására való közvetlen válaszaikról. [11]

1.2. A glikoziláció

A fehérjék sokféleségének kialakításában és a folyamatos változások fenntartásában a poszt-transzlációs módosításoknak kiemelkedő szerepük van. A fehérjék egyedi és speciális szerepének betöltését többek között a poszt-transzlációs módosítások: az oxidáció, glikoziláció, foszforiláció, ubikvitináció, acetiláció, metiláció, hidroxiláció, nitroziláció és a szulfatálás... stb. teszik lehetővé.

A fehérjék glikozilációjának szerkezeti jellemzésével és funkciójának meghatározásával a glikoproteomika foglalkozik. A glikoziláció emlősök esetén az egyik leggyakoribb poszt-transzlációs módosulás, és a fehérjék több, mint felénél előfordul [12, 13].

A glikoziláció fontos szerepet játszik a fehérjék végső térszerkezetének és szerkezeti stabilitásának kialakításában, a sejtek közötti kölcsönhatásokban és kommunikációban (sejtadhézió, endocitózis, molekuláris felismerés), különböző fehérje-fehérje és fehérje-egyéb kölcsönhatásokban (receptor aktiváció) és az immunválaszban antigén szerepet tölt be [14-17]. A glikoziláció befolyásolja a terápiában alkalmazott fehérjék hatásmechanizmusát, farmakokinetikai tulajdonságait és stabilitását is [18-20]. Emellett a glikoproteinek biomarker tulajdonságokkal rendelkezhetnek, azaz a diagnosztikában alkalmasak az egészséges és beteg csoportok elkülönítésére [21-24]. A biomarker tulajdonságok jelentőségét alátámasztja, hogy az FDA (Egyesült Államok Élelmezési és Gyógyszerügyi Hivatala) által elfogadott tumor biomarkerek többsége glikoprotein. [25]

1.2.1. A glikoproteinek típusai

A glikoziláció során a fehérjék peptid láncának bizonyos aminosavaihoz különböző oligoszacharid szerkezetek (glikánok) kötődnek. Azokat az aminosavakat, ahova az oligoszacharidok kötődnek, glikozilációs helyeknek nevezzük. Egy adott glikozilációs helyhez ugyanazon fehérje esetében különböző glikánok kötődhetnek, ezt a jelenséget hívják mikroheterogenitásnak és ennek eredményeképpen jönnek létre a különböző glikoformok. [26]

A peptid láncon belül háromféle atomhoz (O, N és C) kötődhetnek a glikán struktúrák:

- O-glikoziláció esetében Ser, Thr, illetve Tyr aminosavak oldalláncában található hidroxilcsoporthoz [27, 28],
- N-glikoziláció során az Asn, ritkábban Arg aminosavak oldalláncában található
 N-atomokhoz [29, 30],

C-glikoziláció esetében pedig a Trp indolgyűrűjének 2-es helyzetű szénatomjához kapcsolódnak [31].

A fehérjék glikozilációjának eredményeképpen jönnek létre a glükózaminoglikánok, vagy más néven proteoglikánok is. A glikán struktúrák – az *O*-glikozilációhoz hasonlóan – itt is Ser, vagy Thr aminosavakhoz kötődnek, de a glikánok típusa, valamint a bioszintetikus folyamatok is különböznek, ezért ezek a típusú molekulák külön csoportot képeznek [15]. A felsorolt esetek közül a továbbiakban az *N*-glikozilációval foglalkozom részletesen.

1.2.2. Az N-glikoproteinek szintézise és típusai

Az N-glikoproteinek szintézisében külső, tápcsatornából felszívódott, vagy intracellulárisan, legtöbbször lizoszómákban degradálódott szacharidok (hexózok, fukóz) vesznek részt. A citoszolban a szacharidok aktiválódnak, egy foszfolipidhez kapcsolódnak, ennek eredményeképpen dolikol keletkezik. A dolikol glikán oldallánca 2 N-acetil-glükózamint, 9 mannózt és 3 glükózt tartalmaz. A dolikol a citoszolból az endoplazmás retikulumba (ER) helyeződik át, és az ER membránjában a dolikolról egy protein-komplex STT3 nevű katalitikus alegysége (lásd 1. ábra [32]) átrakja a glikán oldalláncot az ER-ben megszintetizálódott fehérjére. Az N-glikoziláció feltétele egy három aminosavból álló úgynevezett konszenzus szekvencia jelenléte a fehérjén [33]. A konszenzus szekvencia Asn-X-Ser/Thr aminosavakból áll, ahol "X" Pro kivétel bármi lehet. Egy fehérje több konszenzus szekvenciát tartalmazhat, azonban nem mindegyikhez kötődnek glikánok, tehát a konszenzus szekvencia megléte nem jelent automatikusan glikozilációs helyet. [34] Ezt követően az ER-ben és a Golgiban glikozidáz enzimek bontják ezt a struktúrát, és transzferázok irányítanak oda további aktivált monoszacharidokat. A szintézis terminális lépéseként fukóz és sziálsavak kapcsolódnak az átalakult struktúrához, végül a glikoprotein elhagyja a Golgit és eléri végső szerkezetét. [12, 35, 36]



1. ábra Az N-glikoproteinek szintézise. Készült a [32] irodalmi hivatkozás 1. ábrája alapján.

A szintézis eredményeként háromféle N-glikoprotein jöhet létre: az Asn aminosavhoz mindhárom esetben egy állandó, öt szénhidrátból álló magstruktúra kapcsolódik, amely 2 N-acetil-glükózamint és 3 mannózt tartalmaz, a 2. ábrán látható kapcsolódási sorrendben. A magstruktúrához egyéb szénhidrátok is kötődnek: Amennyiben a glikánok a magstruktúrán kívül csak mannózt tartalmaznak, akkor "high mannose" típusú oligoszacharidokról (2. *ábra*) beszélünk. A hibrid glikánok (2. *ábra*) mind mannóz, mind laktózamin (galaktóz + N-acetilglükózamin) vagy szialillaktózamin (galaktóz + N-acetilglükózamin + sziálsav) egységeket tartalmaznak. Komplex glikánok (2. ábra) esetében a magstruktúrán kívül csak laktózamin, vagy szialil-laktózamin szerkezeteket tartalmaznak az oligoszacharidok. [35, 37] Az említett szerkezeteken kívül mindhárom glikán típus tartalmazhat fukózt is, amely vagy a magstruktúra első-, vagy az oldallánc N-acetilglükózamin egységéhez kapcsolódhat. Az ábrákon kék négyzetekkel az N-acetilglükózamin, zöld körökkel a mannóz, sárga körökkel a galaktóz, lila rombusszal a sziálsav, piros háromszöggel pedig a fukóz szacharidokat jelöltem. A doktori értekezésben előforduló glikánok esetében a fukózokat a magstruktúrához kötődve ábrázoltam.



2. *ábra* Az *N*-glikánok magstruktúrája és az előforduló glikánok típusai: high mannose, hibrid és komplex típusok. Az ábra a GlycoWorkbench 2 szoftverrel készült.

A doktori értekezésben a komplex glikánok elnevezése az alábbi módon történik: A név első tagja a laktózamin egységek számát mutatja (Bi-, Tri-, Tetra-). A második tag a sziálsav (S), a harmadik tag pedig a fukóz (F) egységek számát jelöli. A TriS2F1 (a *2. ábrán* feltüntetett komplex glikán) elnevezés például azt jelenti, hogy a magstruktúrán kívül három laktózaminból, két sziálsavból és egy fukózból áll a glikán. [38]

1.3. Proteomikában alkalmazott elválasztástechnikai módszerek

1.3.1. A proteomika és a glikoproteomika vizsgáló módszerei

A proteomika alapvető feladata a különböző sejtekben, szövetekben, illetve szervekben található fehérjék azonosítása, és a fehérjék speciális tulajdonságainak meghatározása. Ez az összetett feladat modern elválasztástechnikai és analitikai, valamint bioinformatikai módszerek együttes és speciális alkalmazását igényli. Fehérjekeverékek és a fehérjék emésztése során keletkezett peptid keverékek vizsgálatának első lépése a minták komplexitásának csökkentése, amelyre különböző minta-előkészítési és elválasztástechnikai módszereket használnak: főként a gélelektroforézist és a kromatográfiát [39, 40]. A kapott minták kvalitatív és kvantitatív analitikai vizsgálatára a tömegspektrometria a legalkalmasabb és leggyakrabban alkalmazott technika [41]. A tömegspektrometriai mérési adatok hatékony kiértékelése és értelmezése adatbázis kereséssel [42] történik.



3. *ábra* A standard proteomikai analízis sematikus ábrázolása. Az ábra a [43] irodalmi hivatkozás 1. ábrája alapján készült.

A következő alfejezetek a proteomikában, valamint a glikoproteomikában leggyakrabban alkalmazott vizsgálati módszerekről szólnak. A glikoproteinek vizsgálata proteomikai technikákon alapul. Azonban a proteomikában alkalmazott technikákkal szemben a glikoproteinek vizsgálatával kapcsolatos elválasztástechnikai, tömegspektrometriai és bioinformatikai módszerek még nem rutinszerűek, így szükség van új technikák kidolgozására, illetve azok folyamatos továbbfejlesztésére.

1.3.2. A fehérjék elválasztására alkalmazott módszerek

A biológiai mintákban található fehérjék sokfélesége rendkívüli. A vérplazma 10⁵-10⁶ nagyságrendbe tartozó különböző fehérjét tartalmaz, ebbe beletartoznak a variánsok is. Tovább komplikálja a helyzetet, hogy a fehérjék koncentrációviszonyai között is óriási különbségek vannak, a plazma teljes fehérjetartalmának 99%-át a 22 legnagyobb mennyiségben jelenlévő fehérje teszi ki, és az egyes fehérjék koncentrációja a milli- (10⁻³) és zeptomol/l (10⁻²¹) közötti tartományban található. [44] A minták komplexitásának csökkentése elengedhetetlen, és az analízist a legmodernebb analitikai technikák, így a tömegspektrometria esetében is, többlépéses minta-előkészítés és kromatográfiás elválasztás előzi meg. Elválasztás nélkül a tömegspektrométerben nem kívánt interakciók jöhetnek létre, főként kompetíció és ionszupresszió, az MS készülékek dinamikus tartománya nem elég széles, és az MS egyébként kiváló érzékenysége sem mindig elegendő a kisebb koncentrációjú fehérjék azonosításához, illetve kvantitatív meghatározásához. [45]

A legtöbb proteomikai vizsgálat során a fehérjéket enzimatikus hasítással peptidekre bontják, és a tömegspektrometriai analízis a peptidek vizsgálatával történik (lásd *1.4.3. fejezet*). A minták komplexitása ezáltal még sokszorosára nő, több ezer, közel azonos m/z értékű és különböző intenzitású komponens keletkezik. [45-47] A peptidek elválasztására kivétel nélkül mindig szükség van, ami tipikusan a tömegspektrométerhez on-line kapcsolt kromatográfiával történik (HPLC-MS) [48], és a legtöbb esetben fordított fázisú kromatográfiát jelent [45, 49].

Amennyiben a minta nem csak egy fehérjét tartalmaz, további elválasztási lépések szükségesek. Jelenleg nincs olyan módszer, amely önmagában elégséges lenne ennyire összetett minták elválasztására [47, 50-53]. A peptidek elválasztására számos lehetőség van, további dimenzióként szinte az összes kromatográfiás módszer alkalmazható. Többdimenziós elválasztástechnikai módszerek megválasztásánál figyelembe kell venni azt a fontos szempontot, hogy a különböző módszerek a lehető legnagyobb mértékben ortogonálisak legyenek, azaz különböző és egymástól független tulajdonságok alapján történjen az elválasztás. Ez nagymértékben növeli a rendszer csúcskapacitását és szelektivitását. [54] A módszerek kapcsolása történhet on-line vagy off-line módon is. Rutin proteomikai méréseknél a leggyakrabban a hidrofobicitás alapján elválasztó fordított fázisú kromatográfiát (második dimenzió) a töltések alapján elválasztó ioncserés kromatográfiával (első dimenzió) kombinálják. [47, 49, 55]

1.3.3. A glikoproteinek elválasztására alkalmazott módszerek

A proteomikai vizsgálatokhoz képest a glikoproteomikai vizsgálatok speciális és még inkább összetett minta-előkészítést igényelnek. А glikoformok mikroheterogenitása még tovább növeli a komponensek számát és az egyes glikoformok koncentrációja több nagyságrenddel kisebb lehet a fehérjékénél, így szinte kivétel nélkül többdimenziós elválasztástechnikai módszerek alkalmazására van szükség. Továbbá a glikoproteinek olyan egyedi szerkezeti tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek speciális elválasztástechnikai módszereket igényelnek. [56, 57] Az egyes glikoformok meghatározásánál a második dimenzió a glikoproteinek emésztését követően keletkezett peptidek és glikopeptidek kromatográfiával történő elválasztása HPLC-MS rendszerben. Erre általában - a fehérje azonosításhoz hasonlóan - fordított fázisú kromatográfiát alkalmaznak [37, 58, 59]. Az első dimenzió történhet mind a peptidek-glikopeptidek, mind a még emésztetlen fehérjékglikoproteinek szintjén: [37] dúsítással (1.3.3.1. fejezet), izolálással (1.3.3.2. fejezet) vagy (kromatográfiás) frakcionálással (1.3.3.3. fejezet).

1.3.3.1. Dúsítás

A mintában jelenlévő glikoproteinek és glikopeptidek dúsítására gyakran alkalmaznak különböző lektineket. A lektinek specifikus szénhidrát kötő fehérjék [57, 60, 61]. Az egyes lektinek specificitása más és más, ezért célzottan alkalmazhatók, és a legnagyobb hatékonyság elérése érdekében sokszor kombinálva használják azokat, pl. az oligomannóz típusú hibrid és biantennáris glikánokat kötő con A nevű lektint a komplex glikánokat általában széles körben kötő búzacsíra agglutininnel (WGA) [62]. A lektineken alapuló módszerek a legtöbbször nagyon jó választásnak bizonyulnak, és mára az automatizálás és tömegspektrometriával történő kapcsolás is lehetséges [60, 63]. Azonban a lektineknek vannak olyan hátrányai, amelyek miatt bizonyos esetekben nem alkalmazhatók. A különböző glikoformok szelektív megkötése miatt az eredmények nem tükrözik megfelelően a mintában jelenlévő koncentráció viszonyokat, és ez a glikozilációs mintázatok torzulását hozza létre [64].

1.3.3.2. Izolálás

Egyedi glikoproteinek, illetve egyéb egyedi fehérjék, vagy peptidek izolálására az immunaffinitáson alapuló módszerek a legalkalmasabbak. Az antitestek igen nagy affinitással és szelektivitással kötik meg a célfehérjéket (antigének), és választják el minden más a mintában jelenlévő komponenstől. Immunaffinitáson alapuló elválasztásra napjainkban már kromatográfiával - tömegspektrometriával on-line kapcsolható technikák állnak rendelkezésre. [65, 66] Elérhetők egy fehérje különböző poszt-transzlációs módosulásainak szelektív megkötésére alkalmas antitestek is, leginkább a foszforiláció esetében [67, 68]. Az antitestek nem specifikus kötési tulajdonságai, gyártók közötti variabilitása és a ritkább fehérjék (vagy variánsok) esetében nehézkes hozzáférhetősége azonban korlátozza az immunaffinitáson alapuló módszerek teljes körű elterjedését. Ezenfelül az antitestek ára meglehetősen magas, így sok glikoprotein vizsgálata esetén költséghatékonysági szempontból sem célszerű ezt a technikát választani. [69, 70]

Amennyiben a mintából a nagy koncentrációjú fehérjéket (pl. albumin, immunglobulin G) annak érdekében szeretnénk eltávolítani, hogy a kisebb koncentrációjú fehérjéket tudjuk vizsgálni, akkor depletálásról beszélünk. A depletálás során az immunaffinitási módszerek fent említett hátrányai értelemszerűen sokkal kevesebb problémát okoznak: a nagy koncentrációjú célfehérjékre specifikus antitestek széles körben elérhetők, illetve a mintában maradó fehérje a kiindulásihoz képest minimális mennyisége kevésbé zavaró az analízisnél. [71, 72] A depletálás során hátrányként jelentkezhet a célfehérjékhez nem tartozó, egyéb fehérjék

1.3.3.3. Kromatográfiás frakcionálás

Mint feljebb olvasható, a glikozilációs mintázatok meghatározásánál a második elválasztási dimenzió az emésztett glikoproteinek peptidjeinek elválasztása legtöbbször fordított fázisú kromatográfiával (on-line HPLC-MS).

A HPLC-vel történő frakcionálás első dimenzióként is alkalmazható módszer: több glikoprotein egyszerre történő vizsgálatánál, valamint azokban az esetekben, amikor a célfehérjék az analízis és az értékelés előtt ismeretlenek - tehát antitestek nem használhatók - ez a legjobb választás. Az első dimenzióban történő frakcionálásra

sokféle kromatográfiás és elektroforetikus lehetőség van, és történhet a fehérjék és a peptidek szintjén is (*4. ábra*).[73-75].



ábra Nano-HPLC-MS(/MS) analízist megelőző HPLC frakcionálás peptidek (*bal oldal*) vagy fehérjék (*jobb oldal*) szintjén.

a) Peptidszintű frakcionálás mindkét dimenzióban (4. ábra bal oldal):

Amennyiben szeretnénk összehasonlítani, vagy választanunk kell a mindkét dimenzióban peptidek szintjén történő frakcionálás és az egyik dimenzióban proteinszintű, másik dimenzióban peptidszintű frakcionálás közül, az alábbi szempontokat szükséges figyelembe venni: A fehérje keverékekhez képest a peptidés glikopeptid keverékek még összetettebb rendszerek, ezért a peptidek többszintű frakcionálása során nagyobb esély van nemkívánatos jelenségek pl. különböző interakciók kialakulására. [49, 76] Az intakt fehérjék szintjén történő elválasztást a peptidek többdimenziós elválasztásával összehasonlítva nagyobb szekvencia lefedettséget tapasztaltak, azonban kevesebb azonosított fehérjét találtak, tehát a két módszer komplementernek tekinthető [77, 78], és az aktuális feladattól függ, hogy melyiket érdemes választani. A rutin proteomikai vizsgálatoknál, ahol a fehérjék azonosítása a cél, érdemes többdimenziós peptidek alapján történik, és legtöbbször nincs is szükség a kisebb intenzitású komponensek azonosítására (lásd *1.4.3. fejezet*).

További hátránya a peptidszintű módszereknek, hogy mivel az egy fehérjéhez tartozó különböző peptideket elválasztják egymástól, ezért azok második szintű elválasztása és tömegspektrometriás vizsgálata csak különböző frakciókból, eltérő kromatográfiás futások során lehet. [77-79] A különböző kromatográfiás futásból történő analitikai vizsgálatok nagyobb hibával terheltek, és az idő-, és költséghatékonyságuk is rosszabb. A többdimenziós peptidszintű elválasztás említett hátrányai a glikozilációs mintázatok vizsgálatánál, a kis koncentrációjú glikoformok elkülönítésénél és meghatározásánál komoly problémákat okozhatnak, tehát érdemesebb a protein és peptidszintű frakcionálást kombinálni.

b) Proteinszintű és peptidszintű frakcionálás kombinációja (4. ábra jobb oldal):

Az első dimenzióban a fehérjék szintjén történő elválasztásra, illetve frakcionálásra is sokféle módszer létezik: ioncserén, méretkizáráson, affinitás-, fordított fázisú-, hidrofób- és hidrofil kölcsönhatáson alapuló (HILIC) kromatográfiás módszerek, valamint elektroforetikus módszerek érhetők el. [39, 65, 80-82].

A kétdimenziós gélelektroforézis a proteomikában nagyon gyakran alkalmazott technika [83], amelynek a proteomika széleskörű elterjedésében is fontos szerepe van (lásd 1.1. fejezet). A nagyon bázikus, 10 kDa-nál kisebb, vagy 150 kDa-nál nagyobb molekulatömegű fehérjéknél azonban detektálási problémák, hidrofób karakterű fehérjéknél oldékonysági problémák merülnek fel. Nagyon összetett minták elválasztására a gélelektroforézis felbontóképessége sokszor nem elegendő, továbbá a módszer időigényes is [80, 84, 85]. Ettől függetlenül a kétdimenziós gélelektroforézis a proteomikának mai napig kulcsfontosságú technikája [44, 86]. Az intakt glikoproteinek frakcionálásánál az ioncserés és elektroforetikus módszerek nem tekinthetők a legszerencsésebb választásnak, ugyanis nagy hatékonysággal választják el egymástól az eltérő töltésállapotú részecskéket, pl. a kétdimenziós gélelektroforézis az egyik dimenzióban izoelektromos pont (pI) alapján választ el (a másik dimenzióban pedig molekulatömeg alapján) [87, 88]. A poszt-transzlációs módosulatok a töltésállapotukban sok esetben különböznek egymástól, ez jellemző az ugyanazon fehérjéhez tartozó különböző glikoformokra is (a sziálsavak eltérő száma miatt). Tehát egy fehérje teljes glikozilációs mintázatának meghatározása itt sem lehetséges ugyanabból a frakcióból. Ezenfelül a gélek alacsony terhelhetősége a kis koncentrációjú glikoformok megfelelő mennyiségben történő felvitelét is nehezíti.

Fordított fázisú kromatográfiával is lehetséges az intakt fehérjék frakcionálása [77, 78, 82, 89]. Ez a módszer hidrofobicitás alapján választja el egymástól az egyes komponenseket [90-93], tehát fehérjék elválasztása esetén elméletileg a peptidlánc tulajdonságai vesznek részt a kölcsönhatási folyamatokban, és az ezzel kapcsolatos méret, konformáció, illetve stabilitás [94, 95], a töltések pedig kevésbé befolyásolják azokat. A fordított fázisú nagyobb pórusméretű kromatográfiás oszlopok [96-100] alkalmasak lehetnek intakt glikoproteinek frakcionálására az egyes glikoformok elválasztása nélkül. A helyzet azonban ennél komplikáltabb: egy vizsgálatban azt tapasztalták, hogy a fordított fázisú kromatográfiával elválasztott fehérjék hidrofobicitása egy-egy frakción belül széles határok között mozog, és az átlag a frakciók között sem változik nagyobb mértékben. Tehát az elválasztás nem csak hidrofobicitás alapján történik, hanem további kölcsönhatások is részt vesznek az elválasztási folyamatokban [77]. Ezek közül a legfontosabbak az elektrosztatikus kölcsönhatások, amelyek az ionpárképzők - leggyakrabban trifluor-ecetsav következtében alakulnak ki [101]. A feljebb említett oldhatósági problémák és az irreverzibilis adszorpció, és következményei: a rossz visszanyerhetőség és az átszennyezés (carry over) [77, 79] erősen fehérje és oszlopfüggők. Továbbá nem függenek az alkil lánc hosszától, a pórusmérettől, és a fajlagos felülettől sem, és előre sem jelezhetők igazán [99]. Glikoproteinek esetén ezek a problémák valószínűleg kevésbé jelentősek, mivel a glikoproteinek polaritása nagyobb, de itt is vannak ellentmondásos adatok [99].

Mivel az emésztést követően a glikopeptidek elválasztására legtöbbször a proteomikában is használt fordított fázisú kromatográfiát alkalmazzák (második dimenzió), felmerülhet a kérdés, hogy mennyire hatékony az első dimenzióban is ugyanezt a módszert alkalmazni. Azonban itt nem peptidek, hanem fehérjék szintjén történő frakcionálásról beszélünk, tehát a két minta nem ugyanazokat a komponenseket tartalmazza, így csak pszeudo-ortogonalitásról beszélhetünk. A fordított fázisú kromatográfia szelektivitása az egyes mintákban lévő különböző komponensek iránt más és más, egy vizsgálat szerint igen széles kromatográfiás ablakban eluálódtak a komponensek mindkét dimenzióban, és igen jó csúcskapacitást értek el [77].

22

Összességében a fordított fázisú kromatográfiával történő intakt fehérje frakcionálásról nem áll rendelkezésre elegendő információ, ami alapján eldönthető, hogy a módszer alkalmazható-e komplex mintákban található fehérjék glikozilációs mintázatának meghatározására. Doktori munkám során többek között ennek részletes vizsgálatával foglalkoztam.

1.4. A tömegspektrometrián alapuló proteomika

A proteomika fejlődésében óriási nagy előrelépést jelentett a tömegspektrometria. A tömegspektrometria az ESI (lásd *1.4.1.1. fejezet*) és MALDI ionizációs módszerek megjelenésének köszönhetően vált alkalmassá a fehérjék vizsgálatára. Kiemelkedően nagy érzékenysége - attomólnyi (10⁻¹⁸) peptidek kimutatására is képes [102, 103] - és gyakorlatilag teljesen automatizált működése következtében mára a proteomika nélkülözhetetlen és egyeduralkodó analitikai technikájává vált. A tömegspektrometria a fehérjék azonosítását és kvantitatív meghatározását, valamint a fehérjék közötti interakciók és a poszt-transzlációs módosítások vizsgálatát is lehetővé teszi. [104-109]

1.4.1. A tömegspektrometria

A tömegspektrometria alapjainak és elméletének részletes tárgyalása kívül esik a doktori értekezés tárgykörén, a tömegspektrometrián alapuló proteomika módszereinek bemutatásához néhány fogalom tisztázása mégis szükséges.

A tömegspektrometria a molekulatömeg, pontosabban a tömeg/töltés (*m/z*) mérésével analitikai, valamint szerkezeti információk meghatározására alkalmas nagyműszeres technika.

A tömegspektrométer három alapvető részből áll: ionforrásból, analizátorból és detektorból (5. *ábra*). A bejuttatott mintákból (intakt fehérjék vagy peptidek formájában, lásd 1.4.3. fejezet) az ionforrásban gázfázisú, pozitívan vagy negatívan töltött részecskék keletkeznek. Az ionokat az analizátor m/z értékük szerint szétválasztja, végül a különböző m/z értékű komponensek mennyiségét a detektor határozza meg. Eredményül tömegspektrumot kapunk, amely a különböző m/z értékű komponensek ionáram intenzitását ábrázolja. A tömegspektrométer egységei vákuumtérben helyezkednek el, erre az ionok fókuszálása és a levegő részecskéivel való ütközés során bekövetkező mellékreakciók elkerülése érdekében van szükség. Munkám során ESI ionforrással felszerelt QTOF típusú (analizátorú) készülékkel dolgoztam, amelyről részletesebb információ az *1.4.1.1*. és *1.4.1.2*. *fejezetekben* található.



5. ábra A tömegspektrometriás mérési folyamat és a tömegspektrométer fő részei.

A tömegspektrometriában megkülönböztetünk normál- (MS) és tandem tömegspektrometriás (MS/MS) módszereket. Az MS módszer az ionizált komponensek (molekula- és fragmensionok) m/z értékét adja eredményül. Tandem tömegspektrometriával gázfázisú fragmentációs folyamatokban anyaion-leányion kapcsolat határozható meg. A leggyakrabban alkalmazott MS/MS módszer az úgynevezett leányion analízis (product ion scan): a keletkezett ionokat (anyaion, prekurzor ion) további reakcióba viszik, ahol olyan töredékionok (leányionok, fragmensionok, termékionok) keletkeznek, amelyek kizárólag az anyaion fragmentációja során jöhettek létre, tehát az anyaion szerkezetéről nyújtanak információt. Általában több analizátor (az általam alkalmazott QTOF készülék), vagy csapdázó típusú analizátor szükséges a tandem tömegspektrometriás mérésekhez. Az első analizátor választja ki az adott m/z értékű anyaiont, amely ezt követően egy ütközési cellában fragmentálódik, és a fragmensek m/z értéke a második analizátorral vizsgálható (a csapdázó analizátoroknál ez megoldható egy térben és ütközési cellára sincs szükség).

1.4.1.1. Az ESI ionizáció

A lágy ionizációs módszerek megjelenése tette először lehetővé a fehérjék tömegspektrometriai vizsgálatát. Az ESI és a MALDI módszerek kis energiával ionizálnak, kevésbé fragmentálódnak a komponensek és nagyméretű molekulák vizsgálatát is lehetővé teszik. Jól alkalmazhatók nagyobb és bonyolultabb biológiai molekulák és keverékek, többek között fehérjék és peptidek analízisére. A fehérjék tömegspektrometriai vizsgálatának lehetősége óriási előrelépés volt a bioanalitikában, amelynek a jövőbe mutató jelentősége is hatalmas: 2002-ben John Bennett Fenn és Koichi Tanaka Nobel-díjat kapott ezen ionizációs technikák kifejlesztéséért.

Az ESI ionizáció [110] során a minta oldata egy kapillárison keresztül jut az ionforrásba, ahol nagy feszültség, porlasztó gáz és fűtés hatására ionizálódik. A kapilláris és a vele szemben elhelyezkedő ellenelektród között elektrosztatikus tér jön létre és ennek következtében a kapilláris végén a folyadék töltéssel rendelkező cseppekre hullik szét. Az ESI ionizáció egyik legnagyobb előnye, hogy közvetlenül kapcsolható kromatográfiával (HPLC-MS) és mennyiségi meghatározásra is alkalmas. Hátránya, hogy kevéssé tolerálja a szervetlen sókat és egyéb szennyezőket, ezért a kromatográfia során csak illékony additív használható (pl.: ammónium-formiát, ammónium-acetát, hangyasav). Az ionizációs folyamat során többszörösen töltött molekulaionok is keletkezhetnek, és a módszer alkalmas nagy molekulatömegű proteinek vizsgálatára is. [111, 112]

1.4.1.2. A QTOF készülék

Az analizátorokban elektrosztatikus vagy mágneses terek befolyásolják az ionok pályáját, amelynek eredményeképpen az ionok m/z szerint megkülönböztethetők, és m/z értékük meghatározható.

A kvadrupól (Q) analizátor esetében két pár fémrúd közötti elektromos térbe kerülnek az ionok, és a töltött részecskéknek ebben az oszcilláló térben kell rezegve eljutniuk a detektorba, ami csak akkor sikerülhet, ha egyik töltött rúdba sem csapódnak bele. Ez többek között az ionok m/z értékétől is függ. A rádiófrekvenciás (RF) feszültség állítható paramétereitől függően különböző m/z értékű komponensek juttathatók át a fém rudakon, így m/z értékük meghatározható. [113] A repülési idő analizátor (TOF, time-of-flight) elektrosztatikus tér hatására felgyorsítja az ionokat, és

a különböző m/z értékű komponensek eltérő kinetikus energiájuk következtében más és más időpontban jutnak el a detektorig. Tehát itt a feszültség befolyásolásával és az idő mérésével határozható meg az m/z értékük. [114]

Általánosságban a TOF analizátorok széles körben alkalmazhatók, nagyfelbontású mérések végezhetők vele és a tömegpontosságuk is jó. A TOF analizátort kvadrupól analizátorral kapcsolva az MS/MS mérésekre kiválóan alkalmas és napjainkban elterjedt QTOF készüléket kapjuk. A QTOF készülék a nagy felbontásának és a különféle tandem tömegspektrometriás lehetőségeknek köszönhetően jól használható fehérjék azonosítására, kvantitatív meghatározására és poszt-transzlációs módosítások vizsgálatára is. [41]

1.4.2. A HPLC-MS kapcsolás

A folyadékkromatográfia és a tömegspektrometria egymással történő on-line kapcsolása (LC-MS) lehetővé teszi az elválasztási lépések és az analízis automatizálását, valamint nagymértékben növeli a vizsgálatok robosztusságát és megbízhatóságát. Amennyiben nagyhatékonyságú folyadékkromatográfot kapcsolunk a tömegspektrométerhez, akkor HPLC-MS-ről beszélünk. A HPLC-MS kapcsolás a leggyakrabban ESI ionizációs forrással történik, ezt a dolgozatban HPLC-ESI-MS rövidítéssel jelölöm.

A kromatográfián keresztül történő mintabevitel esetében normál-, mikro- vagy nanoáramlásos folyadékkromatográfiát alkalmaznak. Komplex minták nagyon kis koncentrációjú komponenseinek vizsgálatára, illetve olyan mintáknál, amelyekből az elérhető mintamennyiség limitált, a nanoáramlásos folyadékkromatográfia (nano-HPLC) a legalkalmasabb. Ez a módszer nl/perc áramlási sebességgel választja el egymástól a peptideket, a mintát csak nagyon kismértékben hígítja fel – és csapdázó előtétoszlop segítségével a minta töményíthető –, ennek köszönhetően a kis koncentrációjú komponensek is nagy érzékenységgel vizsgálhatók. A nanoáramlásos kromatográfiához speciális kis áramlási sebességre optimált nano-ESI ionforrások kapcsolhatók. [115, 116]

26

1.4.2.1. A HPLC-ESI-MS kapcsolás hosszú távú stabilitása

A HPLC-ESI-MS és különösen a nano-HPLC-nano-ESI-MS rendszerek instabilitása régóta ismert probléma [117]. Ez a proteomikában is elterjedt hosszú, több napon át tartó méréssorozatok reprodukálhatóságát jelentősen csökkenti, amely a kvantitatív analízist nagymértékben nehezíti. Az intenzitások szórásának, amelyet a legtöbbször a kromatográfiás csúcsok görbe alatti területéből vagy magasságából számolnak, több oka van. Az ionforrásban a spray és annak változásai [118, 119], az ionforrás elszennyeződése, az ionszupresszió, a csapdázó és analitikai oszlopok öregedése és egyéb ismeretlen effektusok és más random hibák mind-mind a stabilitás csökkenését okozhatják.

A mérések stabilitásának és reprodukálhatóságának javítására több módszer is létezik [120, 121]. A belső standardok (általában izotópjelölt anyagok) [122, 123] használata során a vizsgálati komponenshez hasonló tulajdonságú anyagot adnak a mintához, amely hasonlóan viselkedik az aktuális mérési körülmények között. A standardok mért intenzitás változásaival a vizsgálati komponens intenzitása korrigálható, és egyes esetekben az abszolút anyagmennyiség is kiszámolható. A belső standardok használatát korlátozza, hogy hasonló elúciós tulajdonságaik miatt ionszupressziót okozhatnak, és hogy nem mindig érhető el a célkomponensnek megfelelő anyag, különösen a proteomikában, ahol a peptideknek sokféle módosulata létezik. [123] Ezenfelül több komponens, amelyek pontos szerkezete előre nem is mindig ismert, egyszerre történő kvantitatív vagy félkvantitatív vizsgálatánál nem is lehetséges a belső standardok alkalmazása.

A hosszú méréssorozatok közben sokszor mérnek úgynevezett minőségellenőrző mintát (QC: quality control), és ezek intenzitásával korrigálják a vizsgálati komponensek intenzitását [124-126]. Egy további módszer a reprodukálhatóság növelésére a csúcsok intenzitásának összegére, vagy a legintenzívebb csúcsra történő normálás [127]. Ez az egyes komponensek változásait nem veszi figyelembe, tehát ha az egyik csúcs nő, és a másik csökken, akkor ezeket a változásokat nem korrigálja, illetve az eredmények értelmezésénél a biológiai jelentést is befolyásolhatja (lásd *5.5.1. fejezet*). Kuligowski és munkatársai δ statisztikát alkalmaztak nagy adathalmazokban különböző effektusok keresésére [128], de korrekciós módszert nem javasoltak.

27

Az említett korrekciós módszerek különböző eredetű és típusú hibákat korrigálnak, így együttes alkalmazásuk is ajánlott; és új, más típusú módszerekkel való kombinálással a stabilitás és reprodukálhatóság nagymértékű javulása várható.

1.4.3. A tömegspektrometrián alapuló proteomika módszerei

A fehérjeminták bevitele történhet intakt fehérje, vagy a fehérjéből keletkezett peptidek formájában.

A peptidek vizsgálatával történő fehérjeazonosítást *bottom-up* módszernek nevezik, és a legtöbb esetben ezt a módszert alkalmazzák. A fehérjékből peptidek enzimatikus hasítással (emésztéssel) állíthatók elő, erre számos enzim létezik, leggyakoribb a tripszin, amely a Lys és Arg aminosavaknál hasít. Habár a fehérjék megemésztése a minták komplexitását sokszorosára növeli és ez sok problémát vet fel, a peptidek mégis sokkal érzékenyebben vizsgálhatók, fragmentációjuk egységesebb és MS/MS módszerekkel akár a teljes szekvenciájuk meghatározható. A megnövekedett komplexitásnak ugyanakkor előnyei is vannak: a fehérjék azonosítása már néhány peptid alapján lehetséges, és az egyes peptidek pontos szerkezetének ismerete miatt az analízis megbízhatóbb is. A speciális tulajdonságú peptidek dúsíthatók és szelektívebben vizsgálhatók (poszt-transzlációs módosítások), és a hidrofób karakterű fehérjék is mérhetők. Fehérjeazonosításra, szekvenálásra, kvantitatív meghatározásra és poszt-transzlációs módosítások vizsgálatára kiválóan alkalmas a *bottom-up* módszer. [129-131]

Az intakt fehérjék vizsgálatát *top-down* típusú módszernek nevezik. A fehérjék direkt fragmentációja nehézkes, ezért a *top-down* módszert fehérjeazonosításra viszonylag ritkán alkalmazzák. Az FT-ICR analizátorokhoz kifejlesztett ECD fragmentációs módszer a kis és közepes méretű intakt fehérjék vizsgálatát lehetővé teszi [132, 133], az 50 kDa-nál nagyobb fehérjék vizsgálata viszont még ezekkel a készülékekkel is problémás [134]. A *top-down* módszert főként fehérje konformáció és fehérje komplex vizsgálatoknál alkalmazzák [129], valamint a *bottom-up* módszer komplementereként a szekvencia lefedettség növelésére [135-137].

Az enzimatikus hasítás során keletkezett peptidek azonosítása történhet normál vagy tandem tömegspektrometriával. Az MS mérések eredményeképpen kapott peptidek molekulatömegét adatbázis kereséssel egy *in silico* peptid listában található

a fehérjékhez tartozó elméleti tömegekkel vetik össze (PMF: peptide mass fingerprinting) [138, 139]. A valószínűsített fehérjéket többféle szempont alapján – többek között a megtalált peptidek száma alapján – pontozzák, és egy adott pontszám felett tekintik azonosítottnak. A PMF technikával történő azonosítás megbízhatatlan és napjainkban már nem is fogadják el. Korábban is csak nem túl komplex minták és jó tömegpontosság esetén alkalmazták a mintában található fehérjék azonosítására. Kis molekulatömegű vagy sok poszt-transzlációs módosítást tartalmazó fehérjék azonosítására pedig egyáltalán nem is használható. Leginkább MALDI-TOF készülékekkel használták, amelyek nem voltak képesek MS/MS mérések felvételére. [131, 140]

A tandem tömegspektrometriával történő azonosítás megbízhatósága sokkal nagyobb. Ekkor nemcsak a peptidek molekulatömegét mérik, hanem azokat fragmentálják is, így az aminosavakat és azok kapcsolódási sorrendjét is meg lehet határozni. Tehát nem csak tömegük, hanem szerkezetük alapján is azonosítják a peptideket, ami a hamis találatok arányát nagymértékben csökkenti. A valószínűsített fehérjék megtalálása itt is adatbázis kereséssel történik a peptidek és fragmensek tömegei alapján. [104, 131, 140, 141]

Adatbázis keresés nélkül, hagyományos manuális értékeléssel és a tömegek egyenkénti megkeresésével a fehérjék azonosítása nagyon hosszú és nehéz, ezért a tömegspektrometrián alapuló proteomika elképzelhetetlen modern bioinformatikai módszerek létezése és folyamatos fejlesztése nélkül. A leggyakrabban alkalmazott szoftverek közé tartozik a Mascot (http://www.matrixscience.com) és a ProteinLynx Global Server (Waters, Milford, MA, USA) is, amelyeket a doktori értekezés adatainak értékelése során használtam. A szoftverek mindegyike egyedi pontrendszer szerint pontozza a fehérje találatokat. A talált fehérjék közül az egy bizonyos ponthatár feletti pontszámú fehérjéket tekintik azonosítottnak. Ez a bizonyos megbízhatósági ponthatár minden keresés esetén más és más, és értéke mind a minta tulajdonságaitól (komplexitás), mind a mérések paramétereitől (tömegpontosság), az adatbázis és a keresés típusától is függ. Az irodalomban szigorú követelmények alapján, és általában a 99% feletti valószínűséggel azonosított találatokat fogadják el. [142-144]

1.4.3.1. Fragmentációs módszerek

Tandem tömegspektrometria esetén a fehérjék és peptidek fragmentációja több helyen is történhet, és ugyanabból a molekulából több különböző fragmens keletkezhet. A fragmensek elnevezésére és megkülönböztetésére a Roepstorff és Fohlman által bevezetett nevezéktant használják [145]. (6. ábra)



6. *ábra* A peptidek fragmentációja során képződő fragmensek jelölése. Az ábra az ACD/ChemSketch szoftverrel készült.

A peptid anyaionok fragmentálásának többféle módja van, a leggyakoribb az ütközés indukált disszociáció (CID: collison induced dissociation) [146]. A CID fragmentáció során a prekurzor ionok inert gázatomokkal (He, Ar) vagy gázmolekulákkal (N₂) ütköznek, és a peptidekből főként *b* és *y* típusú ionok keletkeznek, miközben a labilisabb kötések hasadnak. Ezenkívül bizonyos aminosavakra jellemző speciális immónium ionok is keletkezhetnek és a poszttranszlációs módosítások is lehasadhatnak (pl. foszforiláció, glikoziláció) [147-149]. Mivel a CID során sok esetben csak a preferált kötések hasadnak, és víz és ammóniavesztés is előfordulhat, ezért nagyobb peptidek (több, mint 15 aminosav) esetében a szekvencia lefedettség nem mindig felel meg az elvárásoknak. [134, 150]

Az elektron-transzfer disszociáció (ETD) [151] és az elektron befogásos disszociáció (ECD) [152] során a peptidek elektronokkal ütköznek, aminek eredményeképpen c és z ionok keletkeznek. A fragmentáció mértéke egyenletes a peptid teljes hossza mentén, a szekvencia lefedettség ennek következtében nagyobb és komplementer a CID-val [153-155]. Az ETD és az ECD módszerek nagyobb peptidek és intakt fehérjék fragmentálására és poszt-transzlációs módosítások vizsgálatára is jól használhatók, ugyanis azokat nem hasítják le az aminosavakról [154, 156]. Az ETD és

ECD fragmentáció hatékonysága a pozitív töltések számával nő. A fragmentáció során negatív töltés megy a pozitív peptid ionokra, így csak a minimum 3+ és 4+ töltésű ionok esetén alkalmazható. [41, 134, 150]

1.4.4. Glikozilációs mintázatok meghatározása tömegspektrometriával

A glikozilációs mintázatoknak kétféle típusa van: a *helyspecifikus* és az *átlagolt* glikozilációs mintázatok. A helyspecifikus glikozilációs mintázat esetében az egyes glikozilációs helyekhez kapcsolódó oligoszacharidokat határozzuk meg. Az átlagolt mintázat megadása során a fehérjén található összes glikánt egyszerre, "átlagosan" jellemezzük, és nem tudjuk, hogy azok pontosan melyik glikozilációs helyekhez kapcsolódnak. Több proteint tartalmazó minta esetén az átlagolt glikozilációs mintázatok nem csak az egyes glikozilációs helyek közötti, hanem a glikánok fehérjénkénti eloszlását sem mutatják meg, csak egy együttes mintázatot mutatnak. A helyspecifikus mintázatok sokkal több biológiai információt hordoznak, mint az átlagolt mintázatok, ugyanakkor meghatározásuk is költség- és időigényesebb.

Az átlagolt glikozilációs mintázatok meghatározása a glikánok fehérjékről történő lehasításával történik [157]. A hasítást általában glikozidáz enzimekkel végzik, *N*-glikánok specifikus hasítására a peptid *N*-glikozidáz F (PNGase F) enzim használható [158]. Lehasított glikánok tömegspektrometriás vizsgálata mind MALDI, mind ESI ionizáció alkalmazásával lehetséges [159]. Általában a glikánok detektálásának érzékenységét származékképzési reakciókkal növelik (pl.: permetilezés [160]). A glikánok lehasítását követően a fehérjék az előző fejezetben tárgyalt MS és MS/MS módszerekkel azonosíthatók, és az *N*-glikozilációs helyek is meghatározhatók a PNGase F hatására bekövetkező Asn – Asp csere tömegkülönbségének következtében, a helyspecifikus információ viszont elveszik [59, 161, 162].

A helyspecifikus glikozilációs mintázatok meghatározása a glikoproteinek enzimatikus hasításával, majd tömegspektrometriai vizsgálatával történik. Az emésztés eredményeképpen peptid és glikopeptid keverék keletkezik. A glikopeptidek tömegspektrometriás vizsgálata a peptidekhez képest nehezebb, amelynek több oka van: kicsi a koncentrációjuk, nagyfokú a heterogenitásuk, kicsi a meghatározásuk érzékenysége - főként a savas glikopeptideké a gyakran alkalmazott pozitív ionizációs módban. Az MS méréseket többdimenziós elválasztási és tisztítási lépések előzik meg

31

(lásd 1.3.3. fejezet). A glikoproteinek vizsgálata legtöbbször kromatográfiával kapcsolt ESI ionizációval történik, de MALDI ionizációs módszerrel is lehetséges [163, 164]. MALDI-t főként akkor alkalmaznak, ha az ESI spektrumok a különböző töltésállapotok miatt túl bonyolultak. [37]

A glikopeptidekről szerkezeti információ tandem tömegspektrometriával nyerhető. A glikopeptidek fragmentálását CID módszerrel végezve a glikozid kötések hasadásának valószínűsége nagy, a peptid kötéseké kisebb [165]. A spektrumban főként a glikánokhoz tartozó B és Y fragmensek figyelhetők meg (Domon és Costello által bevezetett nevezéktan [166], *7. ábra*).



ábra A glikánok fragmentációja során képződő fragmensek jelölése. Az ábra az ACD/ChemSketch szoftverrel készült.

A CID fragmentáció során az ütközési energia nagyságától függően különböző mértékben a peptidekhez tartozó *b* és *y* fragmensek is előfordulnak. Alacsony ütközési energia esetén a peptid kötések általában érintetlenül maradnak, és csak a glikozid kötések hasadnak, nagyobb ütközési energia alkalmazásával a peptidek teljesen deglikozilálódnak és megjelennek a *b* és *y* fragmensek (*8. ábra*). Glikopeptidek CID fragmentálása a leggyakrabban ioncsapda [167, 168], QTOF [38, 169] és Orbitrap [170] készülékekkel történik. Az ioncsapda analizátorok a többszörös fragmentációs ciklusnak (MSⁿ) köszönhetően kiválóan alkalmazhatók a glikánok B és Y típusú fragmentálására, majd a második ciklusban a peptidek *b* és *y* típusú fragmentálására, tehát a glikozilációs helyek azonosítására is [171, 172]. [37, 57, 59]



ábra CID technika alkalmazása glikopeptidek alacsonyabb ütközési energián (15 V) glikán (*a*), majd nagyobb ütközési energián (30 V) peptid (*b*) egységeinek fragmentálására. Az ábra az [57] irodalmi hivatkozás 2-3. ábrája.

ECD és ETD fragmentáció során a glikán rész érintetlen marad és a peptidre jellemző c és z fragmensek képződnek (9. *ábra*). Ennek következtében e technikák glikozilációs mintázatok meghatározásánál kiválóan alkalmazhatók a glikopeptidek

szekvencia analízisére és a glikozilációs helyek azonosítására. Amíg az ECD technika csak FT-ICR analizátorú készülékekben érhető el, addig az ETD sokkal szélesebb körben is (ioncsapda, QTOF, Orbitrap). CID-val kombinálva a glikán fragmensek tömegéből a glikán összetételét és elágazásait is meg lehet mondani, így teljes helyspecifikus glikozilációs mintázatok kaphatók. [37, 57, 173-176]



ábra ETD technika alkalmazása glikopeptidek fragmentálására. Az ábra az [57] forrás 6. ábrája alapján készült.

A glikopeptidek tömegspektrometriai mérési adatainak kiértékelésére is állnak már rendelkezésre különböző szoftverek [177-179], de ezek működése még nem annyira megbízható, mint a fehérjék azonosítására való programoké, és felhasználásuk sem olyan széleskörű. Rutinszerűen még nem alkalmazhatók, paramétereiket a különböző minták esetében optimálni kell és működésük használat előtti tesztelése is szükséges. [180]

1.5. Ionizáló sugárzás és glikoziláció

Az élő szervezetekre természetes és mesterséges forrásokból érkező különböző típusú sugárzások gyakorolnak hatást. Természetes sugárzások a környezetből - beleértve a világűrt - érkeznek, a mesterséges sugárzások közé sorolhatók az ipari sugárzások és balesetek, a háborús sugárzások, a napjainkban fenyegető radiológiai terrorizmus, az orvosi gyakorlatban alkalmazott radioterápia, valamint a kutatási célból alkalmazott sugárzások.

A sugárzások típusa szerint megkülönböztetünk ionizáló és nem ionizáló sugárzásokat. Az ionizáló sugárzások energiája nagyobb, képesek atomok és molekulák ionizálására, és a kémiai kötések felszakítására. Az ionizáló sugárzások közé tartozik az alfa-, béta-, gamma-, röntgen- és a rövid hullámhosszú UV sugárzás. A nem ionizáló sugárzások energiája alacsonyabb és hullámhossza nagyobb, ezek általában csak felmelegítik a szöveteket. Ide sorolható a látható fény, a közeli UV-, az infravörös-, mikrohullámú- és rádiósugárzás. [181]

A radiobiológiában az ionizáló sugárzás hatásának vizsgálata során egyre nagyobb a proteomika iránti érdeklődés [181-184]. Az ionizáló sugárzás hatására a genomban bekövetkezett változásokat már számos esetben alaposan tanulmányozták [185-189], azonban a DNS-ben talált károsodások a sugárzás szervezetre gyakorolt hatásának csak egy részét mutatják, és a hatások következményeire nem adnak teljes körű magyarázatot. Az ionizáló sugárzás hatásainak magasabb szerveződési szinteken többek között fehérjéken, sejteken, szöveteken - való vizsgálata, és az ezeken a szinteken zajló molekuláris folyamatok megértése teljesebb képet mutathat. A fehérjék sokkal összetett rendszerek a DNS-nél, sokféleségük is lényegesen nagyobb (10. ábra) és több és bonyolultabb szabályozó mechanizmusok vannak befolyással rájuk. Tehát sokkal gyorsabban, érzékenyebben és változatosabban tudnak válaszolni a szervezetet érő hatásokra. A genommal ellentétben a proteomban bekövetkezett változások a külső hatás megszűnésével és valamennyi idő elteltével a legtöbbször visszarendeződnek az eredeti állapotba, ezért az ionizáló sugárzás közvetlen és hosszú távú hatásai egymástól elkülönítve vizsgálhatók. [182, 184] A fehérjék vizsgálatával megismerhető újabb patofiziológiai utak és mechanizmusok és az azokban résztvevő molekulák azonosítása a sugárterápiás kezelés hatékonyságáról és mellékhatásairól sok új információt nyújthat. [190-194]



ábra A biológiai rendszerek komplexitásának növekedése a genomtól a proteomig. Az ábra a <u>https://www.lifetechnologies.com/hu/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-post-translational-modification.html (2015. június) oldalon található ábra alapján készült.
</u>

Az ionizáló sugárzás hatását a fehérjék poszt-transzlációs módosulásaira is vizsgálták már: foszforiláció [191, 195-197], acetiláció [196], ubikvitináció [198], karboniláció [199, 200], nitroziláció [199, 200] és glikoziláció [201-204] során, és több esetben szignifikáns változásokat találtak.

A glikoziláció és az ionizáló sugárzás kapcsolatáról az irodalomban egyelőre nem sok információ áll rendelkezésre:

a) Egerek besugárzását követően szérum fehérjéket kétdimenziós gélelektroforézissel vizsgáltak, és az izoelektromos pont (*pI*) eltolódását tapasztalták, amely a glikoziláció megváltozása következtében is létrejöhetett [201, 205]. A glikánok fehérjékről való eltávolítását követően a kapott oligoszacharid keverékeket tömegspektrometriával vizsgálták és a különböző struktúrák csökkenését, illetve növekedését tapasztalták. Azonban mivel csak átlagolt mintázatokat határoztak meg, azt nem lehet tudni, hogy adott fehérjékhez köthető-e a különböző típusú glikánok intenzitásának változása, vagy minden fehérje glikozilációja ugyanúgy változik. [201]
- b) Egy másik vizsgálatban ugyancsak egereken a galaktóz, N-acetilgalaktózamin és mannóz tartalmú glikoproteinekben találtak különböző mértékű és lefutású időfüggő változásokat, de a glikoproteinek koncentrációja a dózissal nem mutatott egyértelmű összefüggést, így biodoziméterként nem használható [204].
- c) Humán eredetű vastagbélrák sejtvonalon az integrin béta 1, amely egy glikozilált sejtfelszíni fehérje, szializációjában találtak változást, amelynek eredményeképpen a sejtek sugárzással szembeni rezisztenciája növekedett [202, 203].

Tudomásunk szerint az ionizáló sugárzás helyspecifikus glikozilációs mintázatokra való hatását még nem vizsgálták, így az egyes glikoproteinek változásairól nem rendelkezünk egyelőre információval. Ezenkívül humán mintákon végzett glikozilációs vizsgálatokról sem tudunk.

2. Célkitűzések

Doktori munkám során célom volt a nagy koncentrációjú vérplazma fehérjék helyspecifikus glikozilációs mintázatának meghatározása. A fehérjék glikozilációs mintázatának részletes jellemzése napjainkban még nem tekinthető rutinszerűnek, ezért szükség van megfelelő minta-előkészítési és analitikai módszerek kidolgozására, illetve a már meglévő módszerek széleskörű glikoproteomikai tesztelésére.

Elsőként a plazma fehérjék helyspecifikus glikozilációs mintázatának meghatározására alkalmas módszerek fejlesztését, illetve optimálását végeztem. Egy olyan depletálásból és frakcionálásból álló módszer kidolgozása volt a célom, amely a glikozilációs mintázatok meghatározásához szükséges mennyiségű vérplazma fehérje izolálását lehetővé teszi, és egyszerre több fehérje glikozilációs mintázatának meghatározására is használható. A módszerrel kapcsolatban további elvárás volt, hogy a fehérjék döntő mennyiségét egy frakcióban tudjuk legyűjteni, valamint hogy az egyes intakt fehérjékhez tartozó glikoformokat ne válassza el egymástól, és a glikozilációs mintázatok meghatározása lehetséges legyen egy frakcióból.

A vérplazma minták eleve nagyon összetett rendszerek, amelyben az egyes glikoformok alacsony koncentrációban találhatók meg, így szükség volt a már meglévő minta-előkészítési, mérési és értékelési módszerek megfelelő átalakítására, automatizálására. Ezenfelül célom optimálására és volt а módszerek megbízhatóságának növelése, amelyeket a későbbiekben kvantitatív analitikai vizsgálatokban szeretnénk alkalmazni, ahol az egyes glikoformok kismértékű változásainak pontos meghatározása a feladat. A nano-HPLC-MS mérések nagy szórása ismert probléma, amelynek csökkentését, illetve korrigálását szerettem volna megoldani. Szükség volt még a mérési adatok kiértékelésére alkalmas szoftver paramétereinek megfelelő beállítására úgy, hogy részletes, ugyanakkor megbízható eredményeket kapjunk az értékelés során.

A módszerek kidolgozása és optimálása után több fehérje helyspecifikus glikozilációs mintázatát szerettem volna meghatározni egészséges emberek mintáiban. Ezt követően a kidolgozott módszerekkel különböző betegségekben, és a szervezetet érő külső hatások esetén szerettük volna a glikozilációs mintázatokat megvizsgálni, és az esetleges különbségeket azonosítani, amelyek biomarker tulajdonságú fehérjéket

vagy glikoformokat eredményezhetnek. Doktori munkám során sugárterápiával kezelt betegek mintáinak és az ionizáló sugárzás glikozilációra való hatásának vizsgálata volt a közvetlen célom.

3. Módszerek

3.1. Anyagok és minták

A minta-előkészítés és a kromatográfiás frakcionálás során Milli-Q Ultrapure Water System Milli gradient készülékkel (Millipore, Billerica MA, USA) tisztított desztillált vizet és grádiens minőségű acetonitrilt használtam. A nano-HPLC-MS(/MS) méréseknél HPLC-MS tisztaságú vizet és acetonitrilt használtam.

A depletálás során az Agilent Multiple Affinity Removal Spin Cartridge HSA/IgG (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) készlettel dolgoztam. Az enzimatikus hasításhoz a RapiGest SF nevű felületaktív anyagot a Waters-től (Milford, MA, USA) szereztük be, valamint tömegspektrometriai minőségű tripszint (Promega Corporation, Madison, WI, USA) és *Elizabethkingia meningoseptica*-ból izolált proteomikai minőségű PNGase F enzimet (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) használtam.

A frakcionálási módszer tesztelésekor és a glikozilációs mintázatok meghatározásakor felhasznált vérplazmaminták a budapesti Bajcsy-Zsilinszky Kórház és Rendelőintézetből származnak. Az etikai engedély száma: 1031-6/2012. A standard fehérjéket (alfa-1-savas glikoprotein, haptoglobin, transzferrin) és minden egyéb anyagot, oldószert és reagenst a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO, USA) vásároltuk.

A sugárterápiával kezelt betegek mintáit Lengyelországból kaptuk (Maria Sklodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch, Gliwice). 10 laphámsejtes fej-nyaki rákban szenvedő beteget (50-80 év, 7 férfi, 3 nő) intenzitás modulált sugárterápiával kezeltek. A kezelés 22-50 napig tartott, a besugárzás során alkalmanként 1,8-3 Gy nagyságú dózist a daganat területére fókuszáltak. A teljes dózis 51-72 Gy volt. 3 vérmintát gyűjtöttek minden betegtől: az 'A' jelű mintát a kezelés előtt, a 'B' jelű mintát közvetlenül a kezelés befejezését követően, tehát a teljes dózis besugárzása után, a 'C' jelű mintát pedig 1-1,5 hónappal a kezelés befejezése után. A vérplazmát EDTA hozzáadása és 15 perces 2000 g-n történő centrifugálást követően kapták, majd -80 °C-on tárolták.

3.2. Eszközök és készülékek

A mintákat vákuum centrifugával pároltam be (SpeedVac, miVac Duo Concentrator, Genevac Ltd., Ipswich, Suffolk, UK). Centrifugáláshoz Table Top Refrigerated Centrifuge Hermle Z300K (Hermle Labortechnik Gmbh., Wehingen, Németország) készüléket használtam.

A vérplazma frakcionálására Acquity UPLC[®] készüléket (Waters, Milford, MA, USA) alkalmaztam. A fehérjék elválasztása a legtöbb kísérlet során Poros R2 (polisztirol-divinil-benzol, 10 μ m, 2,1 × 100 mm, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kolonnán történt, némely esetben pedig Agilent mRP-C18 High-Recovery Protein Column (4,6 × 50 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) oszlopot alkalmaztam.

Az emésztett fehérjeminták (peptid keverékek) HPLC-MS(/MS) analízisét nanoAcquity UPLC-n és nano-ESI ionforrással felszerelt QTOF Premier (Waters, Milford, MA, USA) tömegspektrométeren végeztem. A minták koncentrálása és sótalanítása csapdázó oszlopon történt (Symmetry C18 trap oszlop, 180 μ m × 20 mm, Waters Milford, MA, USA), ezt követően a peptidek elválasztására nanoáramlásos fordított fázisú analitikai kolonnát (C18, 1,7 μ m BEH részecskék, 75 μ m × 200 mm, Waters, Milford, MA, USA) használtam.

3.3. Depletálás

A vérplazmából az albumin és immunglobulin G fehérjéket affinitás kromatográfiával távolítottam el.

Az előtöltött kromatográfiás oszlopra 30-50 µl plazmamintát vittem fel és a gyártó standard protokolljának a következő általam módosított változatát követtem:

- 1. Spin oszlop ekvilibrálása 1,5 ml A oldattal LuerLock adapter alkalmazásával.
- 2. 30-50 µl plazmamintát 200 µl-re higítottam A oldattal.
- 3. Higított plazmaminta felvitele a spin oszlopra pipetta segítségével.
- 4. Spin oszlop centrifugálása 250 g-n 10 s-ig.
- Spin oszlop mosása 800 µl A oldattal LuerLock adapterrel. (A 4-es és 5-ös lépések során eluálódó folyadékot egy eppendorf edénybe gyűjtöttem)
- 6. A megkötött albumin és immunglobulin G fehérjéket 2 ml *B* oldattal és LuerLock adapter alkalmazásával eluáltam.
- 7. Spin oszlop ekvilibrálása 4 ml A oldattal.

Az A és B oldatok összetételét a gyártó nem adta meg.

A 4-es és 5-ös lépések során legyűjtött kb. 1000 μ l frakcióhoz, amely az albuminon és immunglobulin G-n kívül minden fehérjét tartalmazott, 30-30 mM koncentrációban K₂HPO₄-ot és citromsavat adtam. A kapott fehérje oldatot 10 kDa-os centrifugális szűrő segítségével 25 μ l-re töményítettem be.

3.4. Frakcionálás

A depletált plazma HPLC frakcionálása fordított fázisú kromatográfiával történt. A kromatográfiás módszer tesztelését standard fehérjékkel (alfa-1-savas glikoprotein, haptoglobin, transzferrin), deglikozilált standard fehérjékkel és depletált plazma mintákkal végeztem. A deglikozilált alfa-1-savas glikoproteint és a deglikozilált transzferrint a következőképpen állítottam elő: 11 μ l, egyesével 300 pmol fehérjét tartalmazó oldathoz 2 μ l 200 mM-os NH₄HCO₃ oldatot és 10 μ l 500 egység/ml PNGase F enzimet adtam és 37 °C -on termosztáltam egy éjszakán át.

A standard és deglikozilált standard fehérjéket 30 pmol - 5 nmol mennyiségben injektáltam, a plazmamintákat 0,5-15 µl térfogatban.

A Poros R2 oszlopon a grádiens elúció során az áramlási sebesség végig 1 ml/perc volt, az oszlophőmérséklet 65 °C. Az A eluens 0,07 v/v% trifluor-ecetsavat tartalmazó víz, a B eluens 0,07 v/v% trifluor-ecetsavat tartalmazó acetonitril volt. A kromatográfiás elválasztás során grádiens elúciót alkalmaztam (*1. táblázat*).

Idő (perc)	A (%)	B (%)
0,0	80	20
0,7	80	20
15,7	30	70
15,8	5	95
17,3	5	95
17,4	80	20
23,4	80	20

1. táblázat A depletált plazma frakcionálása során alkalmazott grádiens.

280 nm-en történő UV-detektálás és a MassLynx szoftver által kijelzett mérési idő segítségével manuálisan gyűjtöttem a frakciókat. A doktori értekezésben található

vizsgálatok során, amennyiben külön nem jeleztem, félperces, azaz 500 µl térfogatú frakciókat gyűjtöttem, az 1-es frakció 3,0 percnél kezdődött és a további frakciókat folytatólagosan számoztam.

Minden 500 μ l térfogatú frakcióhoz 1,3 μ l 25 m/m%-os NH₃, és 1,8 μ l 500 mM koncentrációjú K₂HPO₄ oldatokat adtam, majd a mintákat 30 μ l térfogatra pároltam be.

3.5. Enzimatikus hasítás

A 30 µl térfogatra bepárolt frakciókban található fehérjéket a következő protokoll szerint emésztettem meg:

- 5 μl 200 mM-os NH₄HCO₃ hozzáadása után a fehérjék kitekerése és redukálása 3 μl 0,5 m/v%-os Rapigest-tel és 2 μl 100 mM-os DTT-vel 30 percen át 60 °C-on történt.
- Az alkilálás során 4 μl 200 mM-os NH₄HCO₃-tal és 2 μl 200 mM-os jódacetamiddal inkubáltam a mintákat szobahőmérsékleten és sötétben 30 percig.
- 3. 1,5 μl 40 μM-os tripszint adtam a frakciókhoz, amely 37 °C-on 3 órán át emésztette a fehérjéket.
- Az enzimatikus hasítást 1,5 μl hangyasav hozzáadásával állítottam meg és 30 percig 37 °C-on inkubáltam.
- 30 perces 17000 g-n történő centrifugálás után az áttetsző felülúszó folyadékot pipettáztam át mintatartó edényekbe.

3.6. Nano-HPLC-MS(/MS) analízis

A kromatográfiás körülmények az összes típusú MS(/MS) mérés alatt ugyanazok voltak. Az A eluens 0,1 v/v% hangyasavat tartalmazó víz, a B eluens 0,1 v/v% hangyasavat tartalmazó acetonitril, az analitikai oszlop hőmérséklete 55 °C volt. Az áramlási sebességek és az eluensek keverésének aránya az alábbiak szerint változott:

	Áramlási		
Idő (perc)	sebesség	A (%)	B (%)
	(nl/perc)		
0,0	450	97	3
4,0	450	92	8
5,0	250	92	8
70,0	250	60	40
72,0	450	15	85
90,0	450	15	85
92,0	450	97	3
135,0	450	97	3

2. táblázat A nano-HPLC-MS/(MS) mérések során alkalmazott grádiens.

A tömegspektrometriai mérések paraméterei a követezők voltak:

- Ionizációs mód: ESI(+)
 Kapilláris feszültség: 2,3 kV
 Nanoflow nyomás: 1 bar
- 1 (0110110 (1 11) 011105) 1 0 001
- Forráshőmérséklet: 90 °C
- Kónuszfeszültség: 35 V

Minden egyes vérplazma frakció esetében 3-3 kromatográfiás futásból 3-3 különböző méréstípust végeztem:

A frakciók fehérjetartalmának és az alfa-1-savas glikoprotein genetikai variánsainak meghatározását adatfüggő MS/MS mérésekkel (DDA: data dependent analysis) végeztem, rendszerint 3-3 intenzív peptid csúcs kiválasztásával. 4 s ciklusokat használva, ciklusonként egy teljes MS spektrumból és a 3 legintenzívebb ion MS/MS spektrumából álló adatokat vettem fel. A készülék az anyaionokat 400-1800 *m/z* tartományban választotta ki, az MS/MS spektrumokat 50-2000 *m/z* tartományban vette fel. Az ütközési gáz argon volt, a nyomása 4,05 × 10⁻³ mbar. Az ütközési energia 7-70 eV tartományban változott az anyaion töltési állapota és tömege alapján.

A glikozilációs helyeket és a főbb glikoformokat hasonló adatfüggő MS/MS mérésekkel határoztam meg. A különbség a tömegtartományban és az ütközési energia nagyságában volt. Az anyaiont 780-2000 m/z tartományban választotta ki a készülék, a leányionokat 150-3000 m/z tartományban mérte. Az ütközési energiát 5-55 eV-os tartományban változtattam.

A kis intenzitású glikoformok azonosítását és az összes glikoform kvantitatív meghatározását kiterjesztett dinamikus tartományú MS mérésekkel (dre: dynamic range enhancement) 500-2000 *m/z* tartományban mértem. A készülék többi paramétere megegyezett az adatfüggő MS/MS méréseknél felsoroltakkal. [206]

3.7. Kiértékelés

3.7.1. A fehérjék azonosítása

A frakciók fehérjetartalmának azonosítása és az alfa-1-savas glikoprotein genetikai variánsainak meghatározása a ProteinLynx Global Server v.2.3 (Waters, Milford, MA, USA) szoftverrel történt. A mérési adatokat a Mascot Server v.2.2 (Matrix Science, London, UK) segítségével a SwissProt v.2011_10 szekvencia adatbázis humán adataival hasonlítottam össze. A keresés során egy kihagyott hasítást engedélyeztem, fix módosításként a cisztein karbamidometileződését, variábilis módosításként metionin (Met) oxidációt állítottam be.

3.7.2. A helyspecifikus glikozilációs mintázatok meghatározása

3.7.2.1. Fehérjék glikozilációs helyeinek és nagyobb intenzitású glikoformjainak azonosítása

A glikozilációs helyek azonosítását adatfüggő nano-HPLC-MS/MS módszerrel végeztem a *3.6. fejezetben* leírtak szerint. Ezek a mérések a fehérjék azonosítására használt mérésektől a glikopeptidek speciális tulajdonságainak megfelelően két paraméterben különböztek: a peptidek optimumához képest nagyobb tömegtartományban vettem fel az adatokat és alacsonyabb ütközési energiával történt a fragmentáció.

A nyers mérési adatokból a következőképpen azonosítottam a glikozilációs helyeket: Elsőként a felvett MS/MS spektrumokról kellett eldönteni, hogy melyek tartoznak glikopeptidekhez és melyek egyéb peptidekhez (megjegyzés: a nagyobb tömegtartománynak köszönhetően megnőtt a glikopeptidekről felvett spektrumok aránya, de így is sok esetben peptidekről készültek a spektrumok). A spektrumok kiválogatását a GlycoMiner v.1.13 Beta szoftver [179] segítségével végeztem, amely a glikánok fragmentációs mintázatának jelenléte alapján megbízhatóan azonosította a glikopeptidekhez tartozó spektrumokat. A szoftver a fragmentációs mintázat alapján a glikán típusát is meghatározta, és a mért glikopeptid tömegből a glikán elméleti tömegét levonva kiszámolta a peptid molekulatömegét is (amelynek tömegpontossága tehát megegyezik a mérési kalibráció pontosságával). A peptidről azonban a molekulatömegen kívül egyéb szerkezeti információt nem adott. Ezért a vérplazma frakciókban azonosított fehérjék körében manuálisan kerestem le a nyers mérési adatokból a MassLynx 4.1 (Waters, Milford, MA, USA) vezérlő szoftver használatával, hogy 25 ppm-es tömegtartományban, mely Asn-X-Ser/Thr szekvencia részletet tartalmazó peptid(ek) feleltethető(k) meg az egyes molekulatömegeknek. Amennyiben egy molekulatömeghez több különböző peptidet találtam, akkor az alábbi szempontok figyelembevételével választottam ki, hogy melyik peptidről van szó:

- A valószínűsített peptidek közül kisebb valószínűséggel választottam ki azokat, amelyekben kihagyott hasítási hely (missed cleavage), vagy nem specifikus hasítási hely (non-specific cleavage) volt.
- Nagyobb valószínűséggel választottam ki azokat, amelyek intenzitása nagyságrendileg összemérhető volt a valószínűsített peptid fehérjéjéhez tartozó esetleges egyéb peptidekével.
- Nagyobb valószínűséggel választottam a jobb tömegpontossággal illeszkedő peptideket.

Az összes frakció MS/MS méréseinek ilyen módon történő kiértékelését követően azonosítottam a glikopeptideket és azok intenzívebb glikoformjait. A kisebb intenzitású glikoformokról nem készült adatfüggő MS/MS spektrum, emiatt ezek azonosítása ebben a lépésben nem történt meg.

46

3.7.2.2. A kisebb intenzitású glikoformok azonosítása

A kisebb intenzitású glikoformok azonosítása nano-HPLC-MS mérésekkel történt. Az előzőekben azonosított glikopeptidek peptid tömegének és a különböző glikánok tömegének összegeként kiszámoltam a leggyakoribb komplex típusú glikoformok tömegét minden glikozilációs helyre (44 elméletileg lehetséges glikoform/glikozilációs hely). A számolt *m/z* értékeket manuálisan kerestem le az MS spektrumokban. A manuális keresés során minden megtalált glikoform esetén ellenőriztem a töltést, az izotópeloszlást és az ugyanahhoz a glikopeptidhez tartozó többi glikoformhoz viszonyított retenciós sorrendet. Csak azokat a glikoformokat fogadtam el valósnak, amelyek töltése, izotópeloszlása és retenciós sorrendbeli elúciója megfelelő volt. Amennyiben ezen szempontok figyelembevételével is több csúcsot találtam, vagy egyéb kérdések merültek fel a glikoformok valódiságával kapcsolatban (pl. nem egyezett az irodalomban megtaláltakkal), akkor egyedi MS/MS spektrumokat vettem fel további kromatográfiás futásokból, és azok alapján azonosítottam a glikoformokat.

3.7.2.3. Glikozilációs mintázatok meghatározása GlycoPattern szoftverrel

A 3.7.2.1. és 3.7.2.2. *fejezetekben* leírt módon egy vérplazma minta esetében azonosítottam a frakciókban található fehérjék glikozilációs helyeit és az egyes glikozilációs helyekhez tartozó glikoformokat.

A glikoformok kvantitatív meghatározását a kutatócsoportban fejlesztett GlycoPattern v.2.0 szoftver [206] segítségével végeztem. Az ezzel kapott intenzitás értékek megegyeznek a kromatográfiás csúcs MassLynx (HPLC-MS vezérlő és értékelő szoftvere) által meghatározott területével. A GlycoPattern szoftver működésének lényege a következő: Egy úgynevezett retenciós idő táblázatban beadjuk minden lekeresendő glikopeptid aminosav szekvenciáját és egy a glikopeptid összes lehetséges komplex glikoformját magában foglaló retenciós idő ablakot. A szekvenciából a program kiszámolja a peptid tömegét, majd az egyes szacharidok tömegének hozzáadásával a lehetséges glikoformok elméleti tömegét. Ez a retenciós idő táblázat tartalmazza még három intenzív glikoform manuálisan lekeresett retenciós idejéből meghatároztam a különböző glikán típusok számokkal kifejezhető retenciós időt

47

befolyásoló mértékét, amelyet egy másik, relatív retenciós idő táblázat tartalmaz. A GlycoPattern szoftver a három manuálisan lekeresett nagy intenzitású glikoform retenciós idejének és a relatív retenciós idők ismeretében számolja ki minden egyes glikoform elméleti retenciós idejét.

A lehető legtöbb valós glikopeptid megtalálása és a hamis találatok kiszűrése érdekében optimáltam egy keresési paraméterkészletet, amely a *11. ábrán* látható. A program a találatokat megfelelő tömegpontosság, retenciós idő és a paraméterkészletben szereplő egyéb tulajdonságok (pl. töltés, izotópeloszlás) alapján tekinti valósnak. A sugárterápiával kezelt betegek mintáinak vizsgálata során meghatároztam egy, a kvantitatív meghatározásokhoz szükséges minimális intenzitást, amely >30 beütés/másodperc (a többi vizsgálatnál ez >10 beütés/másodperc, lásd *11. ábra*).

2	F	RawFileSearch	↔ _ □ ×
Input Results 2D Results Settings Extra			
Search Parameters	Gaussian Fitting Parameters	Result Filters	Misc.
Minimum charge state peaks 4	NrOfFittedPeaks 1	Fited peak width min 0.03	Save to file
Maximum diff in Isotope Int 0.01	Min. Chrom. Peak Width (sigma) 0.0200	Fited peak width max 3.00	Load from file
Minimum consecutive points 2	Max. Chrom. Peak Width (sigma) 3.0000	Fited peak height max 100000	
Peak search precision (PPM) 25.00	Min. Chrom. Peak Height 1.0e00	Fited peak R2 min 0.50	
Int. of peak before base 0.35	Max. Chrom. Peak Height 1.0e06	Charge state time delta 0.50	
Peak min height, baseline * 1.00	Smoothing Parameters Smooth window size 7	Qual score min 0.00	
✓ No sigma test for groupping	Smooth times 1	Note: peak width considered at	
No big peaks before base isotope	New Settings		
Ignore isotopes	Collision V factor 1.0	Show All Ion Chromatograms	
Min charge to search 3		→ Set Filters	
Max charge to search 3		2D 1D output	
Set Parameters		Random Fill Start/End 0.0 VI Use absolute values 5.0	

11. ábra A GlycoPattern optimált keresési paraméterkészlete.

A 3.7.2.1.-3.7.2.3. fejezetekben részletesen leírtam, hogyan határoztam meg egy vérplazma minta fehérjéinek helyspecifikus glikozilációs mintázatát frakciónként két kromatográfiás futásból mért adatfüggő MS/MS és egy futásból mért kiterjesztett dinamikus tartományú MS mérésekkel. A további minták analízise során az egyes

glikoformok szerkezetének igazolására és a glikánok közötti relatív retenciós idők meghatározására már nem volt szükség. Ezen minták esetében már frakciónként csak egy kromatográfiás futásból mértem kiterjesztett dinamikus tartományú MS méréseket és minden méréssorozat első és utolsó MS mérésében manuális kereséssel glikopeptidenként 3-3 intenzív glikoform retenciós idejét határoztam meg, ezt követően automatikusan értékeltem ki a méréseket.

A doktori értekezésben a fehérjék esetén bemutatott glikozilációs mintázatok szórását, a köztük lévő különbségeket és az eredmények reprodukálhatóságát a következő módon számoltam: A minta-előkészítés és a mérések együttes reprodukálhatóságának meghatározása során egy vérplazma mintát több részre osztottam szét, és 3 alikvóttal végigcsináltam a minta-előkészítést, a mérést és kiértékelést, amelynek eredményeképpen a glikoformok intenzitásait tartalmazó listát kaptam. Az intenzitáslistákban az egyes komponensek intenzitását az egy glikopeptidhez tartozó glikoform intenzitások összegére normáltam, és az így kapott relatív intenzitások RSD értékét, majd az RSD értékek átlagát határoztam meg a 3 párhuzamos sorozatból.

A sugárterápiával kezelt betegminták eredményeinek értékelésénél az intenzitások normálását kétféleképpen végeztem: az egyes glikoform intenzitásokat a teljes kromatográfiás futásban található glikoform intenzitások összegére normáltam, illetve az egy glikopeptidhez tartozó glikoform intenzitások összegére való normálás hatását is megnéztem (lásd *5.5.1. fejezet*).

4. Eredmények

4.1. A helyspecifikus glikozilációs mintázatok meghatározásának folyamata és az elvégzett glikoproteomikai vizsgálatok

A helyspecifikus glikozilációs mintázatok meghatározásának minta-előkészítési és analitikai folyamata több lépésből áll: A vérplazma mintából depletálással eltávolítjuk a két legintenzívebb fehérjét. A kapott depletált plazmát fordított fázisú kromatográfiával választjuk szét különböző frakciókra. A frakciók fehérjéinek azonosítása bottom up módszerrel történik: A fehérjéket enzimatikus hasítással peptidekre bontjuk, a peptideket nano-HPLC-MS/MS mérésekkel azonosítjuk, amelyeket kereskedelemben kapható szoftverekkel értékelünk ki. A frakciókból további nano-HPLC-MS/MS mérésekkel a fehérjék egyes glikozilációs helyeit azonosítjuk, ezt követően a helyspecifikus glikozilációs mintázatok meghatározását nano-HPLC-MS mérésekkel végezzük. A glikoproteomikai mérések kiértékeléséhez saját szoftvereket használunk. A teljes minta-előkészítési és analitikai folyamat a 12. ábrán látható. A következő fejezetek a folyamat egyes lépéseiről, azoknak kidolgozásáról és/vagy optimálásáról és teszteléséről szólnak. Ezután a nagy koncentrációjú vérplazma fehérjék meghatározott helyspecifikus glikozilációs mintázatát mutatom be és értelmezem. Végül egy klinikai vizsgálat következik, amelyben a sugárterápia glikozilációs mintázatokat befolyásoló hatását vizsgáltam.



12. ábra A helyspecifikus glikozilációs mintázatok meghatározására alkalmazott módszer.

Az egyes minta-előkészítési és analitikai módszerek fejlesztésénél és az elvégzett glikoproteomikai vizsgálatoknál a saját munkám a következő:

- Depletálás: optimálás, tesztelés.
- Fordított fázisú frakcionálás: kidolgozás, optimálás, tesztelés, a vizsgálatok értelmezése.
- Emésztés: egy korábbi, a kutatócsoportban korábban kidolgozott protokollt optimáltam a vérplazma frakciókra.
- Nano-HPLC-MS/MS és nano-HPLC-MS analízis: a kutatócsoportban korábban kidolgozott mérések optimálása a vérplazma frakciókra; a mérések hosszú távú reprodukálhatóságának növelésére polinomiális korrekció kidolgozása, tesztelése és értelmezése.
- Glikozilációs mintázatok meghatározása: a kutatócsoportban korábban fejlesztett szoftverek paramétereinek optimálása, beállítása és tesztelése.
- A munkafolyamat alkalmazásával a nagy koncentrációjú fehérjék glikozilációs mintázatának meghatározása, értelmezése és összehasonlítása az irodalommal.

- Glikozilációs mintázatok meghatározása sugárterápiával kezelt betegek mintáiban, eredmények értelmezése és összehasonlítása az irodalommal.

4.2. Az albumin és immunglobulin G fehérjék depletálása

A frakcionálás előtti depletálás egy gyakori módszer, amellyel csökkenthető a minta komplexitása, így a kromatográfiás oszlopokra a vizsgálandó fehérjékből nagyobb mennyiség injektálható, és a tömegspektrometriás detektálás során is kevésbé nyomják el egymás ionizációját a komponensek. Munkám során a plazma két legnagyobb koncentrációjú fehérjéjét: az albumint és az immunglobulin G-t depletáltam. A gyártó általi standard protokollt módosítottam: Komoly problémát okozott az oszlop töltetének centrifugálás során történő elvesztése, amelyet úgy oldottam meg, hogy amikor lehetséges volt, centrifugálás helyett manuálisan, fecskendővel végeztem az egyes lépéseket. A depletálás végeztével a mintákat 10 kDaos szűrőn töményítettem, és a töményítés során a fehérjék kicsapódását citromsav és K2HPO4 hozzáadásával sikerült megelőznöm. A depletálás hatékonyságát és szelektivitását tömegspektrometrián alapuló proteomikai vizsgálatokkal ellenőriztem: a teljes fehérjetartalom 66%-át és a teljes albumintartalom 80%-át sikerült eltávolítani. A depletált mintákban immunglobulin G-ből csak immunglobulin G3-at mutattam ki (amelynek összmennyisége az összes immunglobulin G 7%-a.) Méréseim alapján a depletálás az albuminon és immunglobulin G-n kívül csak néhány más immunglobulint távolít el a mintából minimális mennyiségben.

4.3. Vérplazma fehérjék frakcionálása

Munkám során fordított fázisú kromatográfiát alkalmaztam komplex fehérjeminták, különös tekintettel emberi vérplazma frakcionálására [207]. A frakcionálás lényegesen csökkenti a minta komplexitását, és lehetővé teszi nemcsak az egyes fehérjék, hanem a kisebb koncentráció tartományban jelenlévő fehérjevariánsok vizsgálatát is. Elsődleges cél volt, hogy olyan módszert találjunk, amely lehetővé teszi a glikozilációs mintázatok meghatározásához szükséges mennyiségű vérplazma frakcionálását, és egyszerre több fehérje glikozilációs mintázatának meghatározására is használható. Továbbá nagyon fontos szempont volt, hogy a fehérjék döntő mennyiségét egy frakcióban tudjuk legyűjteni, valamint hogy a

52

glikozilációs mintázatok meghatározása lehetséges legyen egy frakcióból. A mintázatok egy frakcióból történő meghatározása megnöveli a későbbi analízis megbízhatóságát, robosztusságát és érzékenységét.

A fehérjék kromatográfiás viselkedése fordított fázisú körülmények között elsődlegesen a fehérje hidrofobicitásától függ, ellentétben a legtöbb más típusú izolálási módszerrel, ahol az elválasztásban a töltés játssza a legnagyobb szerepet. A fehérje hidrofobicitását főként a peptidlánc tulajdonságai alakítják ki, a pontmutációknak és a poszt-transzlációs módosulások változékonyságának az elválasztási folyamatokban *elméletileg* elhanyagolható hatása van. Ezt a feltételezést munkám során több esetben megvizsgáltam.

4.3.1. A kromatográfiás módszer

A frakcionálást szokásos analitikai méretű (2,1 mm átmérőjű) HPLC oszlopon végeztem. Az oszlop terhelhetőségének ellenőrzése az elsődleges feladatok közé tartozott, amelyek alapján az oszlopot alkalmasnak találtam a későbbi glikoproteomikai analízishez szükséges mennyiségű plazma minta frakcionálására.

A kromatográfiás paraméterek beállításánál a csúcsok jó felbontása volt a fő szempont. A felbontás mellett a minta hígulását is szükséges figyelembe venni, ez az áramlási sebesség megválasztásánál fontos. Túl híg minták esetén a fehérjemennyiség jelentős része kitapad az edények falára, és a minták bepárlása is nagyon sok időt igényel. 1 ml/perces áramlási sebességgel 0,1-0,2 perc félértékszélességű csúcsokat kaptam, amelyek félpercenként 500 µl térfogatú frakciókba gyűjthetők, és ezek bepárlása néhány órát vesz igénybe. Az optimált kromatográfiás rendszerben felvett depletált plazma UV-kromatogramja a *13. ábrán* látható.

53



13. *ábra* Depletált plazma UV-kromatogramja az optimált kromatográfiás körülmények között (Poros R2 oszlop).

A kromatográfiás frakcionálási módszer reprodukálhatóságát UV-detektálás segítségével teszteltem (integrálás: automata beállításokkal, MassLynx szoftverrel). A retenciós idők reprodukálhatósága 0,15% SD, a csúcs alatti területeké 1,4% volt standard és plazmaminták esetében is. A depletálás és frakcionálás együttes reprodukálhatósága a következő: a retenciós idők szórására változatlanul 0,15%-ot, a csúcs alatti területekére 9,3%-ot kaptam. Az SD értékeket három fehérje standard és egy depletált plazma három fehérje csúcsából, és három kromatográfiás futás adataiból számoltam.

A frakciógyűjtést manuálisan végeztem, ez a minta UV-cellán történő áthaladása után következett, tehát reprodukálhatóságáról a retenciós idők nem adnak információt. A frakciógyűjtés reprodukálhatóságát a következőképpen határoztam meg: Három kromatográfiás futás során gyűjtöttem ugyanabból a depletált plazmamintából frakciókat és egy fehérje (béta-2-glikoprotein) mennyiségét hasonlítottam össze az egymást követő frakciókban. A béta-2-glikoprotein relatív mennyiségét a következő módon határoztam meg: a legyűjtött frakciókat megemésztettem és nano-HPLC-MS mérésekkel vizsgáltam. A béta-2-glikoprotein 3 intenzív peptidjének relatív intenzitását minden frakcióban jelölés nélküli kvantitatív módszerrel határoztam meg,

majd a választott intenzív peptidek relatív intenzitását frakciónként összeadtam és ezzel a számmal jellemeztem az egy frakcióban található béta-2-glikoprotein mennyiségét. A *14. ábrán* látható, hogy a béta-2-glikoprotein főként egy frakcióban gyűjthető. Az ugyanannál a retenciós időnél gyűjtött 3-3 párhuzamos frakció közötti átlagos szórásra 0,8%-ot számoltam, ez jellemzi a frakciógyűjtés hibáját.



14. ábra A béta-2-glikoprotein mennyiségének megoszlása a különböző időpontban gyűjtött frakciók között.

A visszanyerhetőség tesztelésekor a legkevesebb fehérjeveszteséget (80-90%-os visszanyerhetőség) etilén-tetrafluor-etilén (ETFE) kromatográfiás csövek, fluorozott etilén-propilén (FEP) tű és speciális, alacsony fehérjekötésű eppendorfok használatával értem el. Irodalmi forrásokban 50-70%-os visszanyerhetőséget értek el hasonló nyomáson dolgozva [79].

4.3.2. Különböző fehérjék frakcionálásának vizsgálata

Három fehérje: a transzferrin, az alfa-1-savas glikoprotein és a haptoglobin esetén vizsgáltam különböző fehérjevariánsok viselkedését fordított fázisú kromatográfiás tölteten. A vizsgálatok során a glikozilációval kapcsolatos teszteket a fehérjék glikozilált és deglikozilált állapotában, valamint savas és semleges glikoformokon végeztem. A pontmutációk hatását különböző genetikai variánsokon vizsgáltam.

4.3.2.1. A transzferrin vizsgálata

A standard transzferrin UV kromatogramja a *15. ábrán* látható. Egyetlen csúcsban eluálódik, a csúcsnak válla van és aszimmetrikus (tailing effektus), ami ismert jelenség [208]. Megvizsgáltam és megállapítottam, hogy a csúcs vállát és aszimmetriáját nem a glikoformok, illetve genetikai variánsok elkülönülése okozza. A csúcsot keskeny frakciókban (0,1 perc, 100 μl) gyűjtöttem le, és összesen öt különböző részre szedtem szét. A frakciókat a már ismertetett módon feldolgoztam és analizáltam. Azonosítottam a fehérjetartalmat, mind az öt frakció transzferrin fehérjét tartalmazott, és csak egyféle genetikai variánst találtam, valamint a glikozilációs mintázatokban sem találtam különbséget. Deglikozilált transzferrin standardot is injektáltam a HPLC oszlopra és sem csúcsalakban, sem retenciós időben nem találtam eltérést a glikozilált fehérjéhez képest (lásd *5.2.1. fejezet, 25. ábra*).



15. *ábra* Transzferrin fehérje standard UV-kromatogramja a Poros R2 oszlopon mérve (*bal oldali tengely*). Transzferrin mennyisége a depletált plazma frakciókban (*jobb oldali tengely*).

Megállapítottam, hogy a vérplazmában található transzferrin is egy kromatográfiás csúcsban eluálódik. Ez a vizsgálat sokkal összetettebb volt, mint a standard transzferriné: A depletált plazma UV-kromatogramján sok csúcs található (lásd 13. ábra) és egy csúcs alatt nem csak egy fehérje eluálódik, ezért az UVkromatogram alapján nem lehet meghatározni a transzferrin csúcsainak sem számát, sem alakját. A transzferrin elúcióját tömegspektrométerrel is próbáltam követni, azonban a spektrumok túlságosan összetettek voltak. A problémát úgy oldottam meg, hogy a depletált plazmamintából 500 µl-es frakciókat gyűjtöttem, megemésztettem azokat és a transzferrinhez tartozó intenzívebb peptidek mennyiségének meghatározásával (a 4.3.1. fejezetben a béta-2-glikoprotein esetében leírt módszerrel) jellemeztem a transzferrin mennyiségét az egyes frakciókban. A transzferrin relatív intenzitásértékeiből következtettem a transzferrinhez tartozó kromatográfiás csúcsok számára és alakjára. A vizsgálat eredménye a 15. ábrán látható – bordó rombuszokkal jelölve és jobb oldali skálával. Az ábra egyértelműen megmutatja, hogy a transzferrin egy csúcsban gyűjthető le. A szomszéd frakció csak 2%-nyi, az azt követő frakciók pedig csak nyomokban tartalmaztak transzferrint.

4.3.2.2. Az alfa-1-savas glikoprotein vizsgálata

Az alfa-1-savas glikoprotein ORM1 és ORM2 genetikai variánsként fordul elő a vérplazmában, és szekvenciájában több aminosav változékony. Depletált plazma frakcionálását követően *bottom up* kísérletsorozatban (lásd *1.4.3. fejezet*) azonosítottam a két genetikai variánsra jellemző peptid párokat, majd azt vizsgáltam, hogy az optimált körülmények között végzett fordított fázisú frakcionálás során elválnak-e egymástól a genetikai variánsok. Két peptid párt kerestem le a frakciókban: az ORM1 lókuszra a ¹⁵⁴EQLGEFYEALDCLR¹⁶⁷ és ¹⁷¹SDVVYTDWK¹⁷⁹; az ORM2 lókuszra a ¹⁵⁴EQLGEFYEALDCLCIPR¹⁷⁰ és ¹⁷¹SDVMYTDWK¹⁷⁹ peptideket, és mindegyiket ugyanabban a frakcióban találtam meg, amiből azt a következtetést vontam le, hogy a frakcionálás során a genetikai variánsok egy csúcsban eluálódnak.

Az alfa-1-savas glikoprotein molekulatömegének ~40%-át glikánok teszik ki, ami meglehetősen soknak számít a glikoproteinek körében. E fehérje esetében is megvizsgáltam a deglikoziláció hatását. A csúcsalak itt sem változott, de a retenciós idő fél perccel későbbre tolódott, azonban ez ahhoz képest minimális változás, hogy a fehérje felszínének jelentős részét oligoszacharidok borítják [209].

4.3.2.3. A haptoglobin glikozilációjának vizsgálata

Az általam vizsgált standard és vérplazma fehérjék többsége a fentiekhez hasonló kromatográfiás viselkedést mutatott (kromatogramok, illetve MS mérések alapján). Egy lényeges kivételt találtam, a haptoglobint, amely ugyancsak egy csúcsot adott, de a standard fehérje csúcsának elhúzódása hosszabb ideig tartott. Ez a jelenség különösen szembetűnő volt egy, a vizsgálatok korai fázisában alkalmazott oszlopon, ahol a legnagyobb mértékben elhúzódó csúccsal találkoztam, amelynek lecsengése 8 percen át tartott (*16. ábra*). (A normál esetben alkalmazott oszlopon a haptoglobin 5 perc hosszú csúcsban eluálódik.)



16. ábra Haptoglobin fehérje standard UV-kromatogramja (Agilent mRP-C18 oszlop).

Az oszlopról gyűjtött egymást követő vérplazma frakciókból meghatároztam a haptoglobin helyspecifikus glikozilációs mintázatát. A glikozilációs mintázatok között a különböző frakciókban szignifikáns eltérést nem tapasztaltam (lásd *5.2.1. fejezet*), tehát a széles csúcs a haptoglobin esetében sem a glikoformok elválásának következménye.

4.3.3. Glikozilációs mintázatok torzításának vizsgálata

Az alfa-1-savas glikoprotein esetén megvizsgáltam, hogy a fordított fázisú oszlopon történő áthaladás megváltoztatja-e az eredeti fehérje glikozilációs mintázatát. A standard fehérjével két párhuzamosan végzett kísérlet között annyi volt a különbség, hogy az egyik esetben a fordított fázisú oszlopot nem kötöttem be a HPLC rendszerbe, így injektálás után csak a csöveken és egyéb részeken ment keresztül a minta. A két esetben meghatározott glikozilációs mintázat között az összes glikopeptid figyelembevételével 13% szórást számoltam (számítása: *3.7.2.3. fejezet*), ami azt jelenti, hogy a fehérje glikozilációs mintázatát a fordított fázis nem változtatja meg (lásd *5.2.2. fejezet*).

4.4. A fehérjék enzimatikus hasítása

A bepárolt frakciókat a csoportban korábban kidolgozott [210] és általam optimált protokoll segítségével emésztettem meg.

A módszer optimálása során a reagensek mennyiségét és a minták térfogatát állítottam be a fehérjék mennyiségének figyelembevételével. A tripszin 7,8-8,2-es pH tartományban működik optimálisan, ezt NH₄HCO₃ megfelelő koncentrációjával biztosítottam. A részletes protokoll a *3.5. fejezetben* található.

Az emésztési folyamat előtt, annak érdekében, hogy az enzimek jobban hozzáférjenek emésztőhelyeikhez, a fehérjék kénhídjait redukáltam. A felszakított kénhidak visszaalakulást és újabb kénhidak kialakulását a keletkezett tiol csoportok alkilálásával előztem meg. Amennyiben az emésztést frakcionálás is megelőzi, akkor lehetséges a fehérjék (jelen esetben depletált plazma) frakcionálás előtti redukálása és alkilálása. A frakcionálás előtti redukálást és alkilálást (vagy sima denaturálást) az irodalomban több esetben alkalmazzák, javíthatja a kromatográfiás viselkedést és a visszanyerhetőséget, és keskenyebb csúcsokat eredményezhet [97, 211, 212]. Erre standard és depletált plazma fehérjék frakcionálás előtti redukálása és alkilálása egyes fehérjéknél több kromatográfiás csúcs megjelenését eredményezi, ami a mi esetünkben nagyon zavaró. A depletált plazma redukálása és alkilálása során a fehérjemennyiség jelentős része ki is csapódott. Ezen okok miatt ezt a módszert nem alkalmaztam, és a mintákat a frakcionálást követően a tripszines emésztés előtt redukáltam és alkiláltam.

4.5. A vérplazma frakciókban azonosított fehérjék

A megemésztett frakciókban található peptidek azonosítására adatfüggő nano-HPLC-MS/MS módszert használtam a 3.6. fejezetben leírt paraméterekkel. A

59

kiértékelést a 3.7.1. fejezetben található programokkal, adatbázisokkal és keresési paraméterekkel végeztem.

A *3. táblázat* az egyes frakciókban megbízhatóan azonosított 71 fehérjét tartalmazza (a táblázatban az áttekinthetőség miatt a fehérjéket csak a fő frakcióban tüntettem fel, amely frakcióból a glikozilációs mintázatok meghatározását is végeztem). A megbízható azonosítás a minimum két peptid megtalálását és 99% valószínűség feletti azonosítást jelenti [144]. A fehérjéket az Uniprot adatbázis (http://www.uniprot.org) azonosítójával jelöltem (a hivatalos azonosítóban a fehérje rövidítése után a "_HUMAN" tag is szerepel, ezt itt kihagytam, mivel csak humán eredetű fehérjéket vizsgáltam). A teljes nevek megtalálhatók a Rövidítések jegyzékében. A késői frakciókban kevés fehérjét azonosítottam. Nagy retenciós időnél a nagymértékben apoláros fehérjék eluálódnak, amelyek az oszlophoz erősen kötődnek, azonban a mi esetünkben ezek nem célfehérjék.

Frakció száma	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Retenciós idő tartomány (perc)	3,0-3,5	3,5-4,0	4,0-4,5	4,5-5,0	5,0-5,5	5,5-6,0	6,0-6,5	6,5-7,0	7,0-7,5	7,5-8,0
			FHR1	APOH	A1AG1	A1BG	ALBU	APOA2	A2GL	A1AT
				CFAH	A1AG2	C4BPA	ATRN	C1QA	ANT3	AACT
				ECM1	HPT	CFAI	C1R	C1S	APOA4	AFAM
				F13B	HRG	FETUA	CFAB	CERU	CLUS	ALS
				KNG1	PLMN	HEMO	CO6	CO9	GELS	AMBP
					TRFE	THRB	CO7	FINC	HEP2	APOA1
					ZA2G	VTNC	CO8G	HBB	PROS	CO4B
Azonosított							KLKB1	IGHA1		ITIH1
fehérjék							LUM	IGHA2		ITIH2
							VTDB	IGHD		ITIH4
								IGHG3		LAC7
								IGHM		PON1
								IGKC		
								KV302		
								LAC1		
								LAC2		

3. táblázat A frakciókban azonosított fehérjék (a táblázatban az egyes fehérjék csak a fő frakciókban vannak jelölve).

Frakció száma	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Retenciós idő tartomány (perc)	8,0-8,5	8,5-9,0	9,0-9,5	9,5-10,0	10,0-10,5	10,5-11,0	11,0-11,5	11,5-12,0	12,0-12,5	12,5-13,0
	CO4A		CO3	IC1	A2MG			HPTR	APOB	
Azonosított										
fehérjék										

4.6. A meghatározott helyspecifikus glikozilációs mintázatok

A plazma frakciókban a glikoproteinek azonosítását és helyspecifikus glikozilációs mintázatának meghatározását a *3.7.2. fejezetben* leírtak szerint végeztem. A glikozilációs helyek azonosítását adatfüggő nano-HPLC-MS/MS módszerrel végeztem, a kisebb intenzitású glikoformok azonosítása nano-HPLC-MS mérésekkel történt. A kiértékeléseket manuális kereséssel, valamint GlycoMiner és GlycoPattern szoftverekkel végeztem. A GlycoPattern keresési paramétereit optimáltam, így a későbbiekben automatán kereshetők le a mintázatok.

A plazma frakciókból összesen 28 glikoproteint azonosítottam, ezek Uniprot rövidítései a következők: A1AG1_HUMAN és A1AG2_HUMAN, A1AT_HUMAN, A2GL_HUMAN, AFAM_HUMAN, ANT3_HUMAN, APOH_HUMAN, C1R_HUMAN, CERU_HUMAN, CFAB_HUMAN, CFAH_HUMAN, CFAI_HUMAN, CLUS_HUMAN, CO4A_HUMAN, CO4B_HUMAN, FETUA_HUMAN, HEP2_HUMAN, CPN2_HUMAN, HEMO_HUMAN, HPT HUMAN, ITIH1 HUMAN, ITIH2 HUMAN, KLKB1 HUMAN, KNG1_HUMAN, PON1_HUMAN, THRB_HUMAN, TRFE_HUMAN, VTNC HUMAN, ZA2G HUMAN.

A 28 glikoproteinhez tartozó 76 glikopeptid glikozilációs mintázatát vizsgáltam meg és összesen 399 komplex típusú glikoformot azonosítottam.

Elsődleges célom a nagyobb koncentrációjú glikoproteinek helyspecifikus mintázatának meghatározása volt. A *17. ábra* 10 kiválasztott, nagy koncentrációjú fehérje helyspecifikus mintázatát mutatja be, a vizsgált glikozilációs helyeken talált glikoformok relatív eloszlásának ábrázolásával.

63



17. ábra Fehérjék meghatározott helyspecifikus glikozilációs mintázata.

A bemutatott 10 fehérje helyspecifikus mintázatának elemzése során a glikoformok típusát megvizsgálva mindegyik glikopeptidnél a BiS2F0 volt a legintenzívebb és a leggyakrabban előforduló glikoform, amelyet minden glikopeptiden megtaláltam. Ezt követte a BiS1F0, amelyet egy glikopeptid kivételével (kininogén 1, YNSQNQSNNQFVLYR) minden más esetben azonosítottam. A glikoformok között az antennák száma szerint bi- (49%), tri- (43%), és tetra-antennáris (8%) glikánokat találtam. A fukoziláltságot vizsgálva 42%-ban fukózos és 58%-ban nem fukózos oligoszacharidokat azonosítottam, a biantennáris glikánoknál a fukozilált glikopeptidek intenzitása alacsonyabb volt a nem fukoziláltaknál, a kettőnél több antennát tartalmazó glikopeptideknél ez fordítva volt. A szializáltságot vizsgálva aszializált (5%), mono- (28%), di- (42%), tri- (24%) és tetra-szializált (1%) glikánokat azonosítottam a vérplazma fehérjéken. Az egyes glikoformok előfordulási gyakoriságát és összesített relatív intenzitását a 10 bemutatott fehérjén belül a *18. ábra* mutatja. Az azonosított glikánok szerkezete a *4. táblázatban* látható.



18. ábra Azonosított glikoformok relatív intenzitása és előfordulási gyakorisága.



4. *táblázat* Azonosított glikánok szerkezete. Az ábrák a GlycoWorkbench 2 szoftverrel készültek.

4.7. A HPLC-MS méréssorozatok reprodukálhatósága és korrekciója

A glikozilációs mintázatok meghatározásának reprodukálhatóságára a relatív intenzitásokból számolva 15-20% RSD értékek jöttek ki (számítása: lásd 3.7.2.3. *fejezet*). Ezek az értékek az irodalmi értékekkel összemérhetők: Božović és Kulasingam 2012-ben megállapította, hogy a klinikai proteomikai vizsgálatok során a legtöbb esetben a 20%-os szórásnál nem értek el jobbat [213].

Több, különálló kísérletsorozatban meghatároztam az egyes minta-előkészítési lépések, majd a nano-HPLC-MS mérések reprodukálhatóságát is (52 kromatográfiás futásból). Megállapítottam, hogy a nano-HPLC-MS mérések közötti szórás nagymértékben időfüggő, és a hosszú, több napon át tartó méréssorozatok esetén jelentős, 10-15% körüli (sugárterápiával kezelt betegminták kvantitatív mérései).

Azt találtam, hogy az időfüggésből származó szórás polinomiális korrekcióval jelentősen csökkenthető [214]. Adott időnként egy referencia mintát kell mérni, amely komponensei megegyeznek a vizsgálandó mintában található komponensekkel. Először meghatározzuk a kiválasztott komponensek intenzitását a referencia mintákban, és az időfüggésüket egy, a legkisebb négyzetek módszerével illesztett polinommal írjuk le. Erre a negyedfokú polinomot minden esetben megfelelőnek találtam. Ezt követően ezzel a polinommal mind a referencia, mind a vizsgálandó minták intenzitásait korrigáljuk az *1. egyenlet* szerint.

$$A_{x}^{corr} = A_{x}^{meas} * \frac{A_{avr}}{f(x)}$$

1. egyenlet A peptid intenzitások időkorrekciójához használt egyenlet.

Az egyenletben A_x^{corr} a kiválasztott komponens korrigált területe a sorozat *x*-edik kromatográfiás futásában, A_x^{meas} az *x*-edik kromatogramban mért csúcsterület. A_{avr} a komponens átlagos területe a referencia mérésekben, f(x) a komponens polinomiális illesztés alapján számított várható területe az *x*-edik kromatogramban.

A polinomiális korrekciós módszer hatékonyságát normál ESI és nano-ESI ionforrás esetén is megvizsgáltuk. A normál ESI forrásnál egy kevéssé komplex standard fehérjekeveréket vizsgálva a reprodukálhatóság igen nagymértékű növekedését tapasztaltuk: 12%-ról 3%-ra csökkent a szórás (relatív értékekből számolva).

A nano-HPLC-MS mérések polinomiális korrekcióját egy, a doktori értekezésben található (4.8. fejezet), az ionizáló sugárzás hatását vizsgáló méréssorozaton mutatom be számszerűen. A méréssorozatban 4 mintánként minőségellenőrző (QC) mintákat mértem, ez a minták keveréke volt. A minőségellenőrző minták komponenseire negyedfokú polinomot illesztettem és az *1. egyenlet* szerint korrigáltam azok

intenzitását. Komponensenként mindig a legintenzívebb töltésállapot legintenzívebb izotópjának csúcs alatti területeit vizsgáltam. A *19. ábra* a transzferrin Asn432 - CGLVPVLAENYNK peptid TetraS3F0 glikánt tartalmazó glikoformjának korrigálás előtti és azt követő relatív intenzitását mutatja a minőségellenőrző mintákban. (A lineáris egyenesek a korrekció hatékonyságát szemléltetik, és nem a negyedfokú polinomhoz tartoznak.)



19. ábra A polinomiális időkorrekció hatása egy, a minőségellenőrző mintákból kiválasztott glikopeptiden bemutatva.

A minőségellenőrző mintákból kiszámoltam a korrigálatlan és a korrigált mérések szórását, amelyet az 5. *táblázat* tartalmaz. Az adatokból látható, hogy a polinomiális korrekció mind az abszolút, mind a relatív intenzitásokból számolt szórásokat nagymértékben csökkentette, és hogy az abszolút és relatív intenzitásokból számolt szórások egymáshoz nagyon közeliek lettek.

	Szórás (% RSD)	Korrekciót követő szórás (% RSD)
abszolút intenzitás	15,62	8,22
relatív intenzitás	11,55	8,00

5. *táblázat* A nano-HPLC-MS mérések szórásai polinomiális korrekció nélkül és polinomiális korrekciót követően.

4.8. Glikoform intenzitások változása sugárkezelést követően

Vérplazma fehérjék glikozilációs mintázatát vizsgáltam 10 sugárterápiával kezelt beteg esetében [215]. Minden betegtől 3 mintát gyűjtöttek: Az 'A' jelű mintát a kezelés előtt, ez volt az összehasonlítási alap külön-külön minden egyes beteg esetében. A 'B' jelű mintát közvetlenül a kezelés befejezését követően gyűjtötték, ez mutatja az ionizáló sugárzás közvetlen glikozilációs mintázatokra való hatását. A 'C' jelű vérmintát 1-1,5 hónappal a kezelés befejezését követően vették le, ami a sugárzás esetleges hosszú távú hatásairól adhat információt.

A következő 7 fehérje helyspecifikus glikozilációs mintázatát vizsgáltam: A1AG1_HUMAN és A1AG2_HUMAN, APOH_HUMAN, CFAH_HUMAN, FETUA_HUMAN, HPT_HUMAN, KNG1_HUMAN, TRFE_HUMAN. Összesen 19 glikopeptid, 171 glikoformjának intenzitását határoztam meg az egyes minták esetében, ezek közül 99 érte el a mennyiségi meghatározáshoz szükséges intenzitást, így az értékeléseket ezekkel végeztem. Az értékelés során a glikoformok intenzitását kromatográfiás futásonként összegeztem és az egyes glikoformok relatív intenzitását az összegre való normálással számoltam ki. A *6. táblázat* a 99 kiválasztott glikoform 'A' mintákban mért relatív intenzitásának átlagértékét tartalmazza. A glikoform intenzitások egyes emberek közötti, biológiai variabilitása 29% RSD, a mintaelőkészítés és a mérés együttes reprodukálhatósága 17% (számítása: lásd *3.7.2.3. fejezet*). 6. *táblázat* A sugárterápiával kezelt betegek mintáiban vizsgált fehérjék és glikoformjaik, és a glikoformok átlagos intenzitása a kezelés előtt ('A' mintákban).

Uniprot	Clikanantid szakvancia alikán tínusa	Relatív
azonosító	Ginkopeptiu szekvencia, ginkali upusa	intenzitás
APOH_HUMAN	LGNWSAMPSCK_BiS0F0	0,0016
APOH_HUMAN	LGNWSAMPSCK_BiS1F0	0,0568
APOH_HUMAN	LGNWSAMPSCK_BiS1F1	0,0055
APOH_HUMAN	LGNWSAMPSCK_BiS2F0	0,1797
APOH_HUMAN	LGNWSAMPSCK_BiS2F1	0,0085
APOH_HUMAN	LGNWSAMPSCK_TriS1F0	0,0022
APOH_HUMAN	LGNWSAMPSCK_TriS2F0	0,0058
APOH_HUMAN	LGNWSAMPSCK_TriS2F1	0,0034
APOH_HUMAN	LGNWSAMPSCK_TriS3F0	0,0088
APOH_HUMAN	LGNWSAMPSCK_TriS3F1	0,0091
APOH_HUMAN	VYKPSAGNNSLYR_BiS1F0	0,0070
APOH_HUMAN	VYKPSAGNNSLYR_BiS1F1	0,0012
APOH_HUMAN	VYKPSAGNNSLYR_BiS2F0	0,1638
APOH_HUMAN	VYKPSAGNNSLYR_BiS2F1	0,0518
APOH_HUMAN	VYKPSAGNNSLYR_TriS2F0	0,0034
APOH_HUMAN	VYKPSAGNNSLYR_TriS3F0	0,0234
APOH_HUMAN	VYKPSAGNNSLYR_TriS3F1	0,0212
CFAH_HUMAN	ISEENETTCYMGK_BiS1F0	0,0121
CFAH_HUMAN	ISEENETTCYMGK_BiS2F0	0,0740
CFAH_HUMAN	ISEENETTCYMGK_BiS2F1	0,0021
CFAH_HUMAN	ISEENETTCYMGK_TriS2F0	0,0028
CFAH_HUMAN	ISEENETTCYMGK_TriS3F0	0,0040
CFAH_HUMAN	MDGASNVTCINSR_BiS1F0	0,0139
CFAH_HUMAN	MDGASNVTCINSR_BiS2F0	0,0944
CFAH_HUMAN	MDGASNVTCINSR_BiS2F1	0,0017
CFAH_HUMAN	IPCSQPPQIEHGTINSSR_BiS1F0	0,0187
CFAH_HUMAN	IPCSQPPQIEHGTINSSR_BiS1F1	0,0035
CFAH_HUMAN	IPCSQPPQIEHGTINSSR_BiS2F0	0,1070
CFAH_HUMAN	IPCSQPPQIEHGTINSSR_BiS2F1	0,0071
CFAH_HUMAN	IPCSQPPQIEHGTINSSR_TriS3F0	0,0009
KNG1_HUMAN	LNAENNATFYFK_BiS2F0	0,0136
KNG1_HUMAN	LNAENNATFYFK_BiS2F1	0,0030
KNG1_HUMAN	LNAENNATFYFK_TriS2F0	0,0012
KNG1_HUMAN	LNAENNATFYFK_TriS2F1	0,0022
KNG1_HUMAN	LNAENNATFYFK_TriS3F0	0,0051
KNG1_HUMAN	LNAENNATFYFK_TriS3F1	0,0113
KNG1_HUMAN	ITYSIVQTNCSK_BiS1F0	0,0018
KNG1_HUMAN	ITYSIVQTNCSK_BiS2F0	0,0208
KNG1_HUMAN	ITYSIVQTNCSK_BiS2F1	0,0008

KNG1_HUMAN	ITYSIVQTNCSK_TriS2F0	0,0032
KNG1_HUMAN	ITYSIVQTNCSK_TriS2F1	0,0036
KNG1_HUMAN	ITYSIVQTNCSK_TriS3F0	0,0151
KNG1_HUMAN	ITYSIVQTNCSK_TriS3F1	0,0183
KNG1_HUMAN	YNSQNQSNNQFVLYR_BiS2F0	0,0049
TRFE_HUMAN	CGLVPVLAENYNK_BiS0F0	0,0003
TRFE_HUMAN	CGLVPVLAENYNK_BiS1F0	0,0366
TRFE_HUMAN	CGLVPVLAENYNK_BiS1F1	0,0013
TRFE_HUMAN	CGLVPVLAENYNK_BiS2F0	0,1522
TRFE_HUMAN	CGLVPVLAENYNK_BiS2F1	0,0044
TRFE_HUMAN	CGLVPVLAENYNK_TriS1F0	0,0047
TRFE_HUMAN	CGLVPVLAENYNK_TriS2F0	0,0050
TRFE_HUMAN	CGLVPVLAENYNK_TriS3F0	0,0019
TRFE_HUMAN	QQQHLFGSNVTDCSGNFCLFR_BiS1F0	0,0077
TRFE_HUMAN	QQQHLFGSNVTDCSGNFCLFR_BiS1F1	0,0020
TRFE_HUMAN	QQQHLFGSNVTDCSGNFCLFR_BiS2F0	0,1055
TRFE_HUMAN	QQQHLFGSNVTDCSGNFCLFR_BiS2F1	0,0088
TRFE_HUMAN	QQQHLFGSNVTDCSGNFCLFR_TriS2F0	0,0004
TRFE_HUMAN	QQQHLFGSNVTDCSGNFCLFR_TriS3F0	0,0028
TRFE_HUMAN	QQQHLFGSNVTDCSGNFCLFR_TriS3F1	0,0024
FETUA_HUMAN	VCQDCPLLAPLNDTR_BiS1F0	0,0009
FETUA_HUMAN	VCQDCPLLAPLNDTR_BiS2F0	0,0122
FETUA_HUMAN	AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR_BiS1F0	0,0005
FETUA_HUMAN	AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR_BiS2F0	0,0095
FETUA_HUMAN	AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR_BiS2F1	0,0019
HPT_HUMAN	MVSHHNLTTGATLINEQWLLTTAK_BiS1F0	0,0109
HPT_HUMAN	MVSHHNLTTGATLINEQWLLTTAK_BiS2F0	0,0264
HPT_HUMAN	VVLHPNYSQVDIGLIK_BiS1F0	0,0369
HPT_HUMAN	VVLHPNYSQVDIGLIK_BiS2F0	0,2626
HPT_HUMAN	VVLHPNYSQVDIGLIK_BiS2F1	0,0126
HPT_HUMAN	VVLHPNYSQVDIGLIK_TriS1F0	0,0130
HPT_HUMAN	VVLHPNYSQVDIGLIK_TriS2F0	0,0121
HPT_HUMAN	VVLHPNYSQVDIGLIK_TriS3F0	0,0179
HPT_HUMAN	VVLHPNYSQVDIGLIK_TriS3F1	0,0050
A1AG1,2_HUMAN	LVPVPITNATLDR_BiS1F0	0,0034
A1AG1,2_HUMAN	LVPVPITNATLDR_BiS2F0	0,0208
A1AG1,2_HUMAN	LVPVPITNATLDR_TriS2F0	0,0152
A1AG1,2_HUMAN	LVPVPITNATLDR_TriS2F1	0,0090
A1AG1,2_HUMAN	LVPVPITNATLDR_TriS3F0	0,0338
A1AG1,2_HUMAN	LVPVPITNATLDR_TriS3F1	0,0256
A1AG1,2_HUMAN	LVPVPITNATLDR_TetraS2F0	0,0006
A1AG1_HUMAN	LVPVPITNATLDQITGK_BiS2F0	0,0085
A1AG1_HUMAN	LVPVPITNATLDQITGK_TriS2F0	0,0060
A1AG1_HUMAN	LVPVPITNATLDQITGK_TriS2F1	0,0027
---------------	---------------------------	--------
A1AG1_HUMAN	LVPVPITNATLDQITGK_TriS3F0	0,0168
A1AG1_HUMAN	LVPVPITNATLDQITGK_TriS3F1	0,0120
A1AG1,2_HUMAN	NEEYNK_TriS3F0	0,0009
A1AG1,2_HUMAN	NEEYNK_TriS3F1	0,0008
A1AG1,2_HUMAN	SVQEIQATFFYFTPNK_BiS2F0	0,0032
A1AG1,2_HUMAN	SVQEIQATFFYFTPNK_TriS2F0	0,0005
A1AG1_HUMAN	QDQCIYNTTYLNVQR_BiS2F0	0,0022
A1AG1_HUMAN	QDQCIYNTTYLNVQR_TriS2F0	0,0033
A1AG1_HUMAN	QDQCIYNTTYLNVQR_TriS2F1	0,0016
A1AG1_HUMAN	QDQCIYNTTYLNVQR_TriS3F0	0,0082
A1AG1_HUMAN	QDQCIYNTTYLNVQR_TriS3F1	0,0076
A1AG1_HUMAN	QDQCIYNTTYLNVQR_TetraS1F0	0,0008
A1AG1_HUMAN	QDQCIYNTTYLNVQR_TetraS2F0	0,0072
A1AG1_HUMAN	QDQCIYNTTYLNVQR_TetraS2F1	0,0031
A1AG1_HUMAN	QDQCIYNTTYLNVQR_TetraS3F0	0,0054
A1AG1_HUMAN	QDQCIYNTTYLNVQR_TetraS3F1	0,0031

Az ionizáló sugárzás glikozilációs mintázatokat befolyásoló hatását először egy beteg eredményein mutatom be, ezt követi az összes beteg adatainak elemzése.

4.8.1. Egy adott beteg mintáinak vizsgálata

A 20. ábrán az egyik beteg mintáiban mért alfa-2-HS-glikoprotein (Asn156 – VCQDCPLLAPLNDTR peptid; Asn176 – AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR peptid) és a transzferrin (Asn432 – CGLVPVLAENYNK peptid; Asn630 - QQQHLFGSNVTDCSGNFCLFR peptid) glikozilációs mintázata látható. Bordóval jelöltem a besugárzás előtti állapotot ('A' minta), zölddel a 'B' mintában, közvetlenül a sugárterápia után mért eredményeket, szürkével jelölve az ionizációs sugárzás hosszú távú, 'C' mintában mért, hatásai láthatók. A három glikozilációs mintázat között jelentős különbségek vannak: pl. a transzferrin Asn432 glikozilációs helyén található BiS2F0 glikoform relatív intenzitása a kezelés előtt 16% volt, ez a kezelés közvetlen hatására 11%-ra csökkent (31%-os csökkenés), majd 1-1,5 hónap múlva 13%-ra emelkedett. A 'C' mintában mért relatív intenzitás értékek tehát az 'A' és 'B' minta között voltak, ami azt jelenti, hogy a sugárterápia befejeztével a glikozilációs mintázat elkezd a kiindulási állapotba visszarendeződni, de azt ennyi idő alatt nem éri el. Ez a többi beteg és más fehérjék esetén is különböző mértékben megfigyelhető.



20. *ábra* Az alfa-2-HS-glikoprotein és a transzferrin glikozilációs mintázata egy betegtől származó 'A', 'B' és 'C' mintákban.

Ugyanazon beteg mind a hét fehérjére vonatkozó adatait mutatja a 21. ábra. Az ábra két tengelyén a B/A, illetve a C/A ionarányok láthatók. Ez azt mutatja, hogy az egyes glikoformok intenzitása (plazma koncentrációja) a sugárzás közvetlen hatására ('B' minta), illetve hosszabb távú hatására ('C' minta) mennyire tér el ugyanazon a kiindulási (vagyis a kezelés előtti 'A' minta) értéktől. Amikor a B/A arány 1-nél kisebb, akkor az adott glikoform mennyisége az ionizáló sugárzás hatására csökken. Az ábra jól mutatja, hogy a legtöbb ilyen esetben a C/A arány is kisebb 1-nél – vagyis, ha a sugárkezelés határára egy glikoform plazma koncentrációja lecsökken, akkor ez a változás viszonylag hosszú időn át fennmarad. Amennyiben egy glikoform koncentrációja a sugárkezelés hatására megnő (B/A >1), akkor ez a változás is hosszú időn át megmarad (C/A szintén >1). A fenti kvalitatív magyarázaton túlmenően, a 21. ábra egy jó lineáris kapcsolatot mutat a B/A, illetve C/A hányadosok között: a korrelációs együttható 0.8292. Az ábrán látható, hogy némely esetben többszörös változások is előfordulnak, de általában ennél kisebb, 20-30%-os változásokat mértem. Az egyenes meredeksége valamivel kisebb, mint 1 (0.87), ami kvalitatíve azt jelenti, hogy a 'C' mintában (a kezelés befejezése után) az egyes fehérjék koncentrációja lassan kezd visszatérni a kezelés előtti értékhez. ("1" értékű meredekség azt jelentené, hogy a sugárzás hatására bekövetkező változás teljes mértékben fennmarad, "O" értékű

DOI:10.14753/SE.2016.1923

meredekség pedig azt jelentené, hogy a glikoform koncentrációban bekövetkezett változás csak a kezelés ideje alatt jelentkezik.)



21. ábra A sugárzás közvetlen hatásainak mértéke és hosszabb távú effektusainak mértéke egymáshoz viszonyítva, mind a hét fehérje adataiból számolva egy beteg esetén. Az egyes glikoformok 'B' és 'A' mintákban mért relatív intenzitásainak hányadosa (B/A) a sugárzás közvetlen hatásainak mértékét, a 'C' és 'A' mintákban mért hányadosa (C/A) a hosszabb távú effektus mértékét jellemzi.

4.8.2. Az összes beteg mintáinak vizsgálata

A fenti megfigyelések és eredmények a többi beteg mintáinak vizsgálata során is hasonlóak voltak, bizonyos glikoformok intenzitása megnőtt (44%), másoké csökkent (56%). A sugárterápiát követően az intenzitások elkezdenek visszarendeződni, azonban a kiindulási szintet nem érik el. A *22. ábrán* az összes beteg adatai láthatók. Zöld négyzetekkel a B/A hányadosokat jelöltem, az 'x' tengelyen ezek vannak értékük szerinti csökkenő sorrendben. A bordó körök a megfelelő C/A értékeket jelölik. Amikor a zöld négyzetek egy felett vannak, tehát a glikoform intenzitása közvetlenül a radioterápia után megnő, akkor 77% valószínűséggel a bordó

DOI:10.14753/SE.2016.1923

kör is egy felett van, azaz 1-1,5 hónappal a kezelést követően még fennállnak a változások. Azokban az esetekben, amikor a zöld négyzetek egy alatt vannak, tehát a glikoformok intenzitása csökken, az esetek 77%-ában a bordó körök is egy alatt lesznek, tehát 1-1,5 hónap elteltével a csökkenő változások is fennállnak még.



22. ábra B/A és C/A értékek az összes beteg esetén az 'x' tengelyen a B/A hányadosok csökkenő sorrendjébe rendezve. Az egyes glikoformok 'B' és 'A' mintákban mért relatív intenzitásainak hányadosa (B/A) a sugárzás közvetlen hatásainak mértékét, a 'C' és 'A' mintákban mért hányadosa (C/A) a hosszabb távú effektus mértékét jellemzi.

5. Megbeszélés

5.1. Depletálás értékelése

Jó minőségű glikozilációs mintázatok meghatározásához a proteomikai azonosításhoz képest lényegesen nagyobb mennyiségű emésztett fehérjeminta tömegspektrometriai analízisére van szükség. A fehérjék frakcionálása során használt szokásos analitikai méretű HPLC oszlop, és emésztés után a peptidek elválasztása során alkalmazott nano-HPLC oszlop korlátozott terhelhetősége; illetve a tömegspektrométerben zajló ionizációs elnyomási effektusok miatt ajánlott a legnagyobb mennyiségben jelenlévő fehérjék frakcionálás előtti depletálása. A depletálás során a plazma 2-20 legnagyobb fehérjéjét affinitás kromatográfiával szokták eltávolítani. [71, 72, 96] Munkám során két fehérjét: az albumint és az immunglobulin G-t távolítottam el a plazmából, ugyanis elsősorban a további, nagy koncentrációjú fehérjék glikozilációs mintázatának meghatározása volt a célom. A depletálás hatékonysága és szelektivitása saját proteomikai vizsgálataim alapján jónak bizonyult, és a maradék albumin mennyisége már nem zavarta a meghatározásokat. Lényeges szempont, hogy az eltávolított fehérjék között albuminon és immunglobulin G-n kívül csak egyéb immunglobulinokat találtam, tehát az általam vizsgált vérplazma fehérjék analízisét a depletálás nem befolyásolja.

A 23. ábra egy normál plazma és egy depletált plazma UV-kromatogramját mutatja be, amelyet a nem depletált fehérjékre nézve ugyanakkora anyagmennyiségek injektálását követően azonos körülmények között vettem fel. A normál plazma kromatogramja rossz felbontású, 4,15 percnél nagyon széles és elnyúló fehérje csúcsot tartalmaz, amely átfed a többi csúccsal. A depletált plazma kromatogramja sokkal jobb felbontású, a komponensek lényegesen hatékonyabban különülnek el egymástól, ezért sokkal alkalmasabb vérplazma minták frakcionálására.



23. *ábra* Normál plazma (*a*) és depletált plazma (*b*) UV-kromatogramja a Poros R2 oszlopon mérve.

A két fehérje depletálása lehetővé tette a többi nagy koncentráció tartományban jelenlévő fehérje 20-1000 pmol mennyiségben történő izolálását és helyspecifikus glikozilációs mintázatuk meghatározását. Amennyiben a későbbiekben kisebb koncentrációjú fehérjék glikoproteomikai jellemzésére kerül sor, akkor mindenképpen szükség van a további nagy koncentrációban jelenlévő fehérjék depletálására is.

5.2. Vérplazma frakcionálása fordított fázisú kromatográfiával

Célom volt egy vérplazma minták frakcionálására alkalmas módszer kidolgozása, amely glikoproteinek vizsgálatára optimált. Olyan módszerre volt szükség, amely: 1) Alkalmas a glikozilációs mintázatok meghatározásához szükséges mennyiségű vérplazma fehérje izolálására (nagy koncentrációjú fehérjék vizsgálatánál 15 µl depletált plazma), és szimultán több fehérje glikozilációs mintázatának meghatározását is lehetővé teszi. 2) Használata során a fehérjék döntő mennyiségét egy frakcióban tudjuk legyűjteni, és a glikozilációs mintázatok meghatározása lehetséges egy frakcióból.

5.2.1. Glikoproteinek és egyéb fehérje variánsok fordított fázisú frakcionálása

A töltések (izoelektromos pont) alapján elválasztó kapilláris-, vagy gélelektroforézis és ioncserés rendszerekben igen hatékonyan különülnek el egymástól nemcsak a fehérjék, hanem azok egyes variánsai is. [87, 88] A fehérjevariánsok elválasztása a glikozilációs mintázatok vizsgálatánál nem szerencsés, rontja az eredmények megbízhatóságát és a módszer hatékonyságát.

A fordított fázisú kromatográfia hidrofobicitás alapján választja el az egyes komponenseket [90-93], és fehérjék esetén elméletileg főként a peptidlánc tulajdonságai határozzák meg az elúciós sorrendet, a töltések lényegesen kevesebb hatással vannak arra. Erről azonban ellentmondásos adatok vannak (lásd részletesebben *1.3.3.3. fejezet*), és poszt-transzlációs módosulatok viselkedését tudomásunk szerint részletesen még nem is vizsgálták. Ha ez a feltételezés valóban igaz, akkor a poszt-transzlációs módosulások nem különülnek el egymástól az ilyen kromatográfiás rendszerekben, ami azt jelenti, hogy a fordított fázisú kromatográfia alkalmazható a mi esetünkben a vérplazma fehérjék izolálására és glikozilációs mintázatok egy frakcióból történő meghatározására.

A glikoproteinek és egyéb fehérjevariánsok fordított fázisú kromatográfiás viselkedésének vizsgálata az elsődleges feladataim közé tartozott. Standard és plazmafehérjék elúciója szinte kivétel nélkül egy kromatográfiás csúcsban történt, a csúcs viszont sokszor aszimmetrikus (tailing effektus) vagy elhúzódó volt. Ennek többféle oka lehet: erős kötődés az oszlophoz, töltés-, illetve oxidációs variánsok, konformerek, pontmutációs variánsok és egyebek mellett poszt-transzlációs módosulatok elkülönülése is okozhatja.

Különböző genetikai variánsok fordított fázisú kromatográfiás viselkedését az alfa-1-savas glikoprotein segítségével tanulmányoztam, és az egyes változatok között elválasztást nem találtam. Mivel az alfa-1-savas glikoprotein a többi fehérjéhez képest meglehetősen sok variábilis aminosavat tartalmaz, így eredményeiből következtetni lehet arra, hogy a többi fehérje esetén sem különülnek el az általam használt

kromatográfiás rendszerben a genetikai variánsok. Ezt megerősíti, hogy a transzferrin fehérje csúcsának vizsgálata során sem találtam pontmutációs különbséget a csúcs eleje és vége között.

Mivel a fordított fázisú frakcionálást főként glikoproteomikai vizsgálatok során szeretnénk alkalmazni, a poszt-transzlációs módosulások közül a glikozilációra végeztem különböző teszteket. A különböző glikoformok között egy fehérje esetében sem tapasztaltam elválasztást az optimált kromatográfiás körülmények között. A transzferrin vállal rendelkező és aszimmetrikus csúcsa, valamint a haptoglobin nagymértékben elhúzódó elúciója során végig ugyanolyan arányban találtam meg a glikoformokat. A 24. ábra a haptoglobin Asn241 - VVLHPNYSQVDIGLIK helyén azonosított mintázatot mutatja az egymást követő vérplazma frakciókban. Az összes frakcióban azonosított csúcsokból számolva a glikozilációs mintázat szórása 18,8% RSD. A glikozilációs mintázatok meghatározásának szórása 15-20% (számítása: 3.7.2.3. fejezet), tehát a 8 frakcióból meghatározott glikozilációs mintázatok között szignifikáns eltérés nincsen.



24. *ábra* Haptoglobin Asn241 - VVLHPNYSQVDIGLIK peptid glikozilációs mintázata az egymást követő frakciókban (Agilent mRP-C18 oszlopról gyűjtött frakciók).

A haptoglobin ezen példájának bemutatásával az volt a célom, hogy extrém körülmények között ellenőrizzem a módszerben rejlő hibákat. A kísérlet egy, a vizsgálatok korai fázisában használt oszlopon történt, és ez volt az az eset, ahol a legnagyobb mértékben elhúzódó csúccsal találkoztam. Ezért itt vártam a glikozilációs mintázatban esetlegesen bekövetkező legnagyobb különbségeket. Ennél nagyobb hibákra máshol sem lehet számítani.

Egy további extrém eset, a teljes deglikoziláció hatását is megvizsgáltam. A teljesen deglikozilált transzferrin retenciós ideje sem különbözött az eredeti standardéhoz képest (25. ábra), annak ellenére, hogy a teljes deglikoziláció hatása a fehérje hidrofobicitására lényegesen nagyobb, mint a különböző glikoformok közötti hidrofobicitásbeli különbség. A teljesen deglikozilált alfa-1-savas glikoprotein is csak fél perccel eluálódott később, ami ahhoz képest, hogy molekulatömegének 40%-át glikánok alkotják, nagyon kismértékű változásnak számít.



25. *ábra* Normál transzferrin standard (*a*) és deglikozilált transzferrin standard (*b*) UVkromatogramja (Poros R2 oszlop).

Eredményeim megerősítik azt a korábbi feltételezést, hogy a fehérjék fordított fázisú elválasztása főként a peptidlánc tulajdonságaitól függ, és a glikoziláció kevés hatással van arra. A tesztek alapján a fordított fázisú kromatográfiával történő frakcionálás lehetővé teszi egy fehérje döntő mennyiségének egy frakcióban történő legyűjtését. A csúcsok válla, aszimmetrikus alakja vagy nagymértékű elhúzódása esetén sem a glikoformok szétválása okozza az aszimmetrikus csúcsalakot, tehát ilyen esetben a fő frakció analízise elégséges reprezentatív glikozilációs mintázatok meghatározására.

5.2.2. A glikozilációs mintázatok torzítatlansága

Egy további kísérletsorozatban az alfa-1-savas glikoprotein standard glikozilációs mintázatát frakcionálással és anélkül is meghatároztam. A 26. *ábra* az alfa-1-savas glikoprotein egyik glikozilációs helyén (Asn56 - NEEYNK peptid) található glikoformokat mutatja be frakcionálást követően (tehát a fordított fázison való áthaladás után), illetve frakcionálás nélkül. A kétféleképpen meghatározott mintázat között 13% RSD különbséget számoltam, ami a glikoproteomikai vizsgálatok szórásával összemérhető. Ez azt jelenti, hogy a fordított fázison való áthaladás során a glikozilációs mintázatok nem változnak meg, és nem történik szelektív kötődés, ami torzítaná azokat. Az általam meghatározott mintázatok tehát valósnak tekinthetők.



26. *ábra* Az alfa-1-savas glikoprotein Asn56 - NEEYNK peptid glikozilációs mintázata fordított fázisú kromatográfiás oszlopon való áthaladás után (frakcionált), illetve frakcionálás nélkül.

A glikozilációs mintázatok torzítatlansága a lektinekkel szemben tekinthető nagy előnynek. A lektineket gyakran alkalmazzák a glikoproteinek és glikopeptidek dúsítására, azonban mivel szelektíven kötnek meg bizonyos glikoformokat, a glikozilációs mintázatok torzulását eredményezik [64].

5.2.3. Frakcionálás hatása a glikozilációs mintázatok minőségére

A vérplazma fehérjék helyspecifikus glikozilációs mintázatának vizsgálata a plazma minták egyébként is nagyon nagy komplexitása, és ezenfelül az egy fehérjéhez tartozó glikoformok szerkezeti és több nagyságrendet átölelő koncentrációbeli változatossága miatt minden esetben többlépéses minta-előkészítést igényel. Az általam alkalmazott módszer a következő izolálási/elválasztási lépéseket tartalmazza: *1*. depletálás, *2*. intakt fehérjék fordított fázisú frakcionálása, *3*. emésztés során keletkezett peptidek és glikopeptidek fordított fázisú elválasztása. Ebben a fejezetben azt vizsgálom meg, hogy az intakt fehérjék fordított fázisú frakcionálásának milyen hatása van a glikozilációs mintázatok minőségére.

5.2.3.1. A glikozilációs mintázatok minőségének jellemzése

A doktori értékezésben a glikozilációs mintázatok minőségét az azonosított *glikoformok száma*, azaz a fehérjék mintázatának részletessége alapján jellemeztem, és e szempont alapján hasonlítottam össze a saját eredményeimet egymással, vagy az irodalomban található mintázatokat a saját eredményeimmel. A glikoformok száma a proteomikai mutatók közül az azonosított peptidek számának feleltethető meg. Hátránya, hogy az azonosított peptidek számával ellentétben, nem minden esetben tudjuk, hogy az adott minta esetében mi számít teljes részletességnek. Ugyanazon fehérje glikozilációs mintázatainak összehasonlításánál azonban viszonylag jól használható a módszer különböző laboratóriumban mért minták esetén is, de itt sem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a különböző standardok, vagy biológiai minták változatossága is nagy lehet.

A proteomikában az azonosítás minőségének jellemzésére használt további paraméterek a következő problémák miatt nem alkalmazhatók, illetve nem ajánlottak:

 A pontozási rendszer a különböző értékelő szoftverek esetén más és más lehet, és az eredmények nem mindig hasonlíthatók össze.

- A szekvencia lefedettség a helyspecifikus glikozilációs mintázatoknál nem értelmezhető, mivel a glikoformok nagy részét m/z és retenciós idő alapján azonosítják (lásd 5.3.1. fejezet).
- A felvett tömegspektrumok száma vagy a glikoformok intenzitása sem hasonlítható össze a különböző laborok és készülékek között.
- A frakcionálás glikoproteomikai jelentőségét ki lehet még fejezni azoknak a fehérjéknek a számával, amelyekről megfelelő minőségű mintázatok kaphatók. Azonban itt is ugyanaz a probléma, mint a glikoformok számánál, hogy egyértelműen nem definiálható, hogy az adott fehérje esetén mi számít megfelelő minőségnek.

5.2.3.2. Haptoglobin glikozilációs mintázatának meghatározása frakcionálással és frakcionálás nélkül

A kutatócsoportban a korábbiakban depletált plazmából frakcionálás nélkül határozták meg néhány fehérje glikozilációs mintázatát. Az irodalomhoz hasonló és általában elvárt részletességű mintázatokat csak a 2-3 legnagyobb koncentrációban jelenlévő fehérjénél kaptak, az eredmények közül a haptoglobin mintázatát publikálták [206]. Ezzel a mintázattal hasonlítottam össze a haptoglobin általam frakcionálással meghatározott mintázatát. A 27. ábra bordó színnel a csak depletált plazma, zöld színnel a frakcionált depletált plazma mintázatát mutatja. A kétféle mintázat meghatározásánál az egyéb minta-előkészítési lépések és mérési paraméterek megegyeztek, azonban az értékelés során én szigorúbb feltételek teljesülése mellett fogadtam el a glikoformokat. Az Asn184 - MVSHHNLTTGATLINEQWLLTTAK frakcionálás frakcionálással 9. peptiden nélkül 10. Asn241 az _ VVLHPNYSQVDIGLIK peptiden frakcionálás nélkül 8, frakcionálással 17 glikoformot sikerült azonosítani. Az Asn241-en tehát egyértelműen megnőtt az azonosított glikoformok száma a frakcionált mintában. Az Asn184-en frakcionálás nélkül eggyel több glikoformot találtak. Ez a glikoform azonban valószínűleg az ionizáció során egy másik glikoformból keletkező fragmens, amelyet az általam használt értékelési módszer már kiszűr. A haptoglobinról más laboratóriumokban sikerült még részletesebb mintázatokat kapni, de ott teljesen más minta-előkészítési, mérési és értékelési módszerekkel dolgoztak [216-223] (lásd 5.3.3. fejezet).



27. *ábra* A haptoglobin két glikozilációs helyén meghatározott mintázatok frakcionálás nélkül mért depletált plazmában és egy depletált plazma frakcióban (5-ös frakció).

A 2-3 legnagyobb koncentrációjú vérplazma fehérje glikozilációs mintázatának részletessége a haptoglobin példája alapján a frakcionálási lépés beiktatásával növekszik. Az ezeknél kisebb koncentrációjú fehérjéknél frakcionálás nélkül nem is sikerült megfelelő helyspecifikus mintázatokat meghatározni.

5.2.4. A frakcionálási módszer értékelése

Tudomásunk szerint intakt fehérjék fordított fázisú frakcionálását követően poszttranszlációs módosításokat csak nagyon kevés esetben vizsgáltak [224, 225]. Hong Wang és munkatársai kétdimenziós frakcionálás első dimenziójában anioncserés oszlopon, és második dimenziójában fordított fázisú oszlopon választott el egymástól intakt fehérjéket [225]. Ebben az esetben tehát nem volt lényeges szempont, hogy az egyes glikoformok ne váljanak el egymástól. A módszer sok frakcionálási/dúsítási lépésből áll és több napot vesz igénybe. Hátránya az én módszeremhez képest a hosszú analízis idő, valamint az egyes glikoformok szelektív dúsítása, ami torzítja a mért mintázatot.

Saját vizsgálataim alapján a fordított fázisú frakcionálás alkalmas helyspecifikus glikozilációs mintázatok egy frakcióból történő meghatározására, ami azért előnyös, mert az emésztést követően a második dimenziós elválasztás alkalmával az egy fehérjéhez tartozó glikoformok egy kromatográfiás futásból azonosíthatók. Az egy kromatográfiás futásból történő analízis hibája kisebb, és az idő- és költséghatékonysága is jobb, mint a több futásból álló vizsgálatoké. A szokásos analitikai (2,1 és 4,6 átmérőjű) oszlopokat alkalmasnak találtam a nagy koncentrációjú fehérjék glikozilációs mintázatának meghatározásához szükséges mennyiségű vérplazma frakcionálására.

A módszer további előnye, hogy a helyspecifikus glikozilációs mintázatokat nem torzítja, azaz a glikoformok eloszlását nem változtatja meg. Ez a szempont különböző minták összehasonlításánál, amilyenek a biomarker vizsgálatok is, kevésbé fontos. Azonban kiemelkedő jelentősége van akkor, amikor a glikozilációs mintázatok biológiai- és élettani jelentőségéről, vagy monoklonális antitestek gyógyszerészeti hatóságok követelményeinek megfelelő, részletes jellemzéséről van szó.

5.3. Vérplazma fehérjék helyspecifikus glikozilációs mintázatának meghatározása és a mintázatok jelentősége

Amíg a *helyspecifikus* glikozilációs mintázatok az egyes glikozilációs helyekhez kapcsolódó oligoszacharidokat adják meg, addig az *átlagolt* mintázatoknál nem tudjuk, hogy a glikánok mely glikozilációs helyekhez kapcsolódnak, több fehérjét tartalmazó minták esetén azt sem, hogy melyik fehérjéhez tartoznak. Az átlagolt mintázatok meghatározása sokkal egyszerűbb, az irodalomban is a legtöbbször ezzel találkozunk, és a glikán könyvtárak is főként ezt tartalmazzák [226-228]. Azonban komplex biológiai minták fehérjéinek glikozilációjáról az egyes fehérjék teljes izolálása nélkül nem nyújtanak elég információt. A helyspecifikus mintázatok sokkal több biológiai információt hordoznak, és az egyes fehérjéken és az egyes glikozilációs helyeken jelen lévő glikán szerkezeteket és azokban bekövetkező változásokat is mutatják mind izolált, mind komplex fehérjeminták esetén.

5.3.1. A vérplazma fehérjék glikozilációs mintázatának meghatározására alkalmazott módszer

A helyspecifikus glikozilációs mintázatok meghatározása során a glikoproteinek és az egyes glikozilációs helyek azonosítása, valamint a különböző glikoformok azonosítása és kvantitatív meghatározása több kromatográfiás futásból, különböző MS méréstípusokkal történt. A kiértékelést manuálisan és a kutatócsoportban fejlesztett szoftverek (GlycoMiner, GlycoPattern) segítségével végeztem, a szoftverek optimális paraméterkészletét és működését manuálisan lekeresett adatokkal állítottam be, illetve ellenőriztem.

A nagyobb intenzitású glikoformok azonosítása minden esetben MS/MS mérések alapján történt. A kisebb intenzitású glikoformok azonosításánál a töltést, az izotópeloszlást és a többi glikoformhoz viszonyított relatív retenciós sorrendet vettem figyelembe. Egyedi MS/MS spektrumokat csak akkor vettem fel, ha ezek alapján nem lehetett egyértelműen azonosítani vagy kizárni a glikoformokat. Az irodalomban a glikoformok azonosítását legtöbbször az úgynevezett "Accurate Mass Tag Retention Time", azaz pontos tömeg és retenciós idő alapú módszerrel végzik [229]. Az általam alkalmazott azonosítási módszer a tömegen és retenciós időn kívül az izotópeloszlást is figyelembe veszi, tehát az eredményeim megbízhatósága nagyobb, mint az irodalomban található glikozilációs vizsgálatok többségéé.

Az alkalmazott mérési és értékelési módszerek lehetővé teszik a vérplazma fehérjék helyspecifikus glikozilációs mintázatának automatikus meghatározását. A módszer előnye, hogy a nano-HPLC C18-as fordított fázisú kromatográfiás körülményeinek változása esetén is viszonylag egyszerűen és gyorsan kiértékelhetők a minták:

- Új, az előzővel azonos típusú és azonos gyártótól származó oszlop bekötése után, vagy hosszabb idő (néhány hét) elteltével készült mérések esetén méréssorozatonként az első és utolsó mérésben glikopeptidenként 3-3 intenzív glikoform retenciós idejét kell manuálisan megkeresni. Ezt követően automatikusan folytatódik az értékelés (a sugárterápiás minták méréseinek kiértékelésénél is ez történt).
- Gyártók közötti oszlopváltás, kromatográfiás paraméterek megváltozása (futás hossza, grádiens meredeksége, elválasztás hőmérséklete) esetén az előzőeken felül új relatív retenciós idő táblázatot - amely a különböző glikán típusok retenciós időt befolyásoló mértékét tartalmazza - kell készíteni.

5.3.2. Az alkalmazott módszer részletes értékelése a ceruloplazmin példáján bemutatva

A meghatározott helyspecifikus mintázatok jelentőségét és a módszerek hatékonyságát részletesen a ceruloplazmin példáján keresztül mutatom be. A ceruloplazmin rézkötő fehérje, emiatt kék színű. Ferroxidáz aktivitással rendelkezik, a Fe²⁺ ionokat Fe³⁺ ionokká oxidálja, és a sejtmembrán két oldala közötti vastranszportban is részt vesz. Az Uniprot adatbázis (http://www.uniprot.org) adatai szerint 1065 aminosavból áll és 6 db N-glikozilációs hellyel rendelkezik (Asn138, Asn358, Asn397, Asn588, Asn762, Asn926), amelyek közül 4 (Asn138, Asn358, Asn397, Asn762) tartalmaz komplex glikánokat. A ceruloplazmin plazma fertőzések és koncentrációja gyulladások, traumás állapotok alkalmával megemelkedik, és a gyulladásos citokinek megváltoztatják a glikozilációs mintázatát. A fehérje szolid rosszindulatú tumorok diagnosztikus markere, amelyben fontos szerepe lehet a glikozilációnak, így a részletes helyspecifikus mintázatok meghatározásának jelentősége megkérdőjelezhetetlen. [169]

Harazono és munkatársai kereskedelemben elérhető tisztított szérum ceruloplazmin minta helyspecifikus mintázatát határozták meg [169]. Tripszinnel történő emésztést követően nano-HPLC-ESI-MS/(MS)-sel vizsgálták a glikopeptideket. Négy helyen azonosítottak komplex glikánokat, az Asn138 -EHEGAIYPDNTTDFQR peptiden 5 különböző glikánt, az Asn358 _ AGLQAFFQVQENK peptiden 3 Asn397 glikánt, az

ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR peptiden 4 glikánt és az Asn762 -ELHHLQEQNVSNAFLDK peptiden 7 glikánt. (7. *táblázat*)

Ugyancsak Harazono és munkatársai egy másik vizsgálat során kereskedelemben elérhető standard kevert szérumból határozták meg fehérjék helyspecifikus glikozilációs mintázatát [216]. Elsőként az albumint depletálták, majd tripszines emésztést követő nano-HPLC-MS/(MS) analízissel azonosították az egyes glikoformokat. Szérumból a ceruloplazmin három glikopeptidjének mintázatát sikerült meghatározniuk: az Asn138 glikozilációs helyen *4* különböző glikánt, az Asn397 helyen *3* glikánt és az Asn762 helyen *5* glikánt azonosítottak. Az Asn358 glikozilációs helyet tartalmazó peptidet nem azonosították. (7. *táblázat*)

A saját eredményeim vérplazmából a következők voltak: az Asn138-on 8, az Asn358-on 5 és az Asn397-en 8 glikánt azonosítottam. Az Asn762-es glikozilációs helyet nem találtam meg. (7. *táblázat*)

Glikozilációs hely	Izolált standard Harazono és mtsai.	Szérum Harazono és mtsai.	Plazma Saját
Asn138	5	4	8
Asn358	3	-	5
Asn397	4	3	8
Asn762	7	5	-
Összesen	19	12	21

 táblázat A ceruloplazmin fehérjén azonosított glikoformok számának összehasonlítása különböző minták és laboratóriumok esetén.

Az azonosított glikoformok számának nagysága leginkább az alkalmazott tömegspektrométerek érzékenységétől függ, ezért a minta-előkészítési módszerek összehasonlításának csak hasonló tömegspektrométerrel végzett mérések esetén van értelme. Harazono és munkatársai a tömegspektrometriai méréseket mindkét esetben QSTAR Pulsar QTOF (AB/MDS Sciex, Toronto, Kanada) készülékkel végezték, amely paraméterei nagyon hasonlítanak az általam használt Waters QTOF készülékhez. A glikánok azonosítása mindhárom esetben hasonlóan történt: Harazono és munkatársai a nagyobb intenzitású glikoformokat MS/MS, a kisebb intenzitásúakat MS – m/z, retenciós idő és töltés alapján azonosították. Én ezek mellett az izotópeloszlást is figyelembe vettem az azonosítás során, tehát szigorúbb követelményeket alkalmaztam.

Harazono és munkatársai az izolált standard mintánál a fordított fázisú nano-HPLC-s elválasztáson kívül nem alkalmaztak egyéb dúsítási, izolálási vagy kromatográfiás módszereket, a szérum mintából pedig az albumint depletálták. Abból, hogy a szérum mintában kevesebb glikoformot találtak, mint az izolált standard vizsgálatánál, arra lehet következtetni, hogy az albumin depletálás és az azt követő egydimenziós fordított fázisú nano-HPLC-s elválasztás nem elég a nagy koncentrációjú fehérjék részletes helyspecifikus mintázatának meghatározására, és mindenképpen szükséges további dúsítási, izolálási vagy kromatográfiás módszereket alkalmazni.

A saját vérplazma méréseim eredményeit Harazono és munkatársai eredményeivel összehasonlítva az izolált standardhoz képest egy glikopeptiddel kevesebbet találtam meg (kiesett a tömegtartományból), azonban a megtalált glikopeptideken több glikoformot azonosítottam a plazma mintából. A szérum mintához képest ugyanannyi glikopeptidet, és több glikoformot azonosítottam vérplazmából. Ez azt jelenti, hogy az albumin – immunglobulin G depletálás és a fordított fázisú kromatográfiával történő frakcionálás kombinációjával, valamint az általam alkalmazott és optimált mérési és értékelési módszerekkel szérum/plazma mintákból részletesebb mintázatok érhetők el. Az eredmények nagy koncentrációjú fehérjék esetén elérik az immunaffinitással izolált standardon kapott mintázatok részletességét, tehát intakt fehérje szinten további izolálási lépésekre nincsen szükség.

5.3.3. A haptoglobin különböző laboratóriumokban meghatározott helyspecifikus glikozilációs mintázata

Az előző fejezetben a ceruloplazmin példáján bemutattam, hogy nagy koncentrációjú fehérjéknél az általam kidolgozott és alkalmazott minta-előkészítési, mérési és értékelési módszerekkel az irodalomban elérhetőhöz hasonló, vagy annál részletesebb mintázatok kaphatók, amennyiben hasonló elválasztási lépéseket és hasonló paraméterekkel rendelkező tömegspektrométert használunk. Más

tulajdonságokon alapuló elválasztási folyamat, vagy újabb, eltérő típusú analizátorral rendelkező tömegspektrometriai mérések elméletileg részletesebb vagy komplementer mintázatokat eredményezhetnek.

Ahhoz, hogy megtudjuk, hogy az általam meghatározott mintázatok minősége (részletessége) eléri-e az irodalomban általában megtalálható mintázatokét, egy gyakran vizsgált fehérje: a haptoglobin mintázatát hasonlítottam össze az irodalomban található mintázatokkal. Az összehasonlításnál nem vittem figyelembe, hogy a haptoglobin milyen eredetű, tehát izolált standard, vagy komplex mintából származik, és hogy milyen módszerekkel és készülékekkel vizsgálták.

A haptoglobin a hemoglobin fehérjét köti, részt vesz annak körforgásában, és védi a vesét a vasionok károsító hatásától. Különböző élettani folyamatok során, gyulladások és rákos betegségek esetén a koncentrációja megnövekszik. Rákos betegségekben glikozilációjának változását is tapasztalták, amelynek következtében megváltoztak a haptoglobin egyéb fehérjéket kötő tulajdonságai. [220, 222] Az Uniprot adatbázis (http://www.uniprot.org) szerint 4 glikozilációs helye van: az Asn184, Asn207, Asn211 és Asn241, ezek közül az Asn184-en és az Asn241-en találhatók komplex glikánok. A lejjebb idézett irodalmi források szerint az Asn207 és Asn211-es helyen is vannak komplex glikánok, de ezek a helyek egy triptikus peptiden találhatók, így analízisük nehézkes, és nem lehet egyértelműen meghatározni, hogy melyik glikán melyik Asn-hez kötődik.

А 28. ábrán Asn184-es helyen látható, hogy az _ **MVSHHNLTTGATLINEQWLLTTAK** peptid 15 glikánt azonosítottak a legrészletesebb vizsgálatban, az Asn241-en - VVLHPNYSQVDIGLIK egy másik *vizsgálatban* pedig 27-et. Én az Asn184-en 9 glikánt azonosítottam, ez a negyedik legjobb eredmény, az Asn241-en pedig 17 glikánt találtam, ez a második legrészletesebb eredmény. Az eredmények között nagy átfedések voltak, komplementer mintázatokat nem találtam.



28. ábra A haptoglobinon azonosított glikoformok száma; az irodalomban talált vizsgálatok: a) [216], b) [217], c) [218], d) [219], e) [220], f) [221], g) [222], h) [223] és a saját eredmények összehasonlítása.

A haptoglobin helyspecifikus glikozilációját a többi plazma fehérjéhez képest nagyon gyakran vizsgálják, mivel nagy a koncentrációja, részletes a glikozilációs mintázata és nagy a biológiai jelentősége. A legmodernebb módszerek bemutatása során is gyakran használják modellfehérjének, amely vizsgálatok alkalmával a miénknél lényegesen újabb és több nagyságrenddel érzékenyebb tömegpsektrométereken végzik a méréseket. Ezeket a szempontokat is figyelembe véve elmondható, hogy az általam kidolgozott minta-előkészítési és a szokásosnál szigorúbb elfogadási követelményeket alkalmazó értékelési technikákkal - egy kevésbé modern tömegspektrométeren is - nagy koncentrációjú fehérjéknél igen részletes eredmények kaphatók. A haptoglobinnál kevesebbet vizsgált fehérjék esetében az eredmények részletesebbek lehetnek, mint az irodalom megtalálható mintázatok.

5.3.4. A meghatározott helyspecifikus glikozilációs mintázatok részletessége és jelentőségük

A nagyobb koncentrációjú vérplazma fehérjék általam meghatározott helyspecifikus mintázata (lásd *17. ábra, 4.6. fejezet*) több esetben részletesebb volt, mint az irodalomban megtalálható mintázatok (pl. kininogén 1), és olyan fehérjék glikoformjait is sikerült azonosítanom, amelyek helyspecifikus mintázatát az irodalomban nem találtam meg (komplement C4-A). Az általam azonosított glikánok előfordulási gyakorisága és relatív intenzitása (lásd *18. ábra, 4.6. fejezet*) megegyezik az irodalomban talált mintázatokéval [230], tehát a glikoformok egymáshoz viszonyított aránya nemcsak a frakcionálás, hanem a teljes módszer során sem torzul, így a meghatározott mintázatok valósnak tekinthetők.

A mintázatok részletessége alátámasztja, hogy a kidolgozott minta-előkészítési, mérési és értékelési módszerek az irodalomban található módszerekkel összehasonlítva igen hatékonyak, és a későbbiekben más, kisebb koncentrációjú fehérjék esetén teljesen új, eddig ismeretlen glikozilációs mintázatok is meghatározhatók vele. A kisebb koncentrációjú fehérjék helyspecifikus mintázatának meghatározása kívül esik az értekezés tárgykörén. Az itt leírt módszerek alkalmazásával a korábban felsorolt kisebb koncentrációjú fehérjék glikopeptidjeit és a fő glikoformokat sikerült azonosítanom - ezek közül több új eredménynek tekinthető - azonban itt a nagy koncentrációjú fehérjékhez hasonló részletességű helyspecifikus mintázatokat nem kaptam. A későbbiekben a részletes mintázatok meghatározásához a legegyszerűbb megoldás a depletált fehérjék számának növelése, ami lehetővé teszi a kisebb koncentrációjú glikopeptidek nagyobb mennyiségben történő nano-HPLC-MS analízisét. További megoldások lehetnek újabb frakcionálási lépések bevezetése, illetve érzékenyebb tömegspektrométerrel történő mérések.

5.4. A HPLC-MS méréssorozatok polinomiális korrekciója

A HPLC-MS mérések reprodukálhatóságának növelésére többféle módszer létezik, amelyeket az *1.4.2.1. fejezetben* soroltam fel. A saját vizsgálataim során több napon át tartó méréssorozatokban egyszerre nagyon sokféle glikopeptid és glikoform intenzitását mérem, ami miatt a belső standardokkal történő kvantitatív vizsgálat gyakorlatilag lehetetlen. A csúcsok intenzitásának összegére vagy a legintenzívebb

DOI:10.14753/SE.2016.1923

csúcsra történő normálás is csak korlátozottan alkalmazható, mivel az egyes komponensek intenzitásának eltérő irányú változásait (növekedés, csökkenés) nem korrigálja.

A hosszú méréssorozatokban a HPLC-MS mérési körülményeinek időfüggő változásaiból származó szórás csökkentésére egy negyedfokú polinomiális függvényen alapuló korrekciós módszert dolgoztam ki. A korrigálás HPLC-ESI-MS esetén 12%-ról 3%-ra [214], nano-HPLC-nano-ESI-MS esetén a dolgozatban bemutatott példában 11,6%-ról 8%-ra csökkentette a minták szórását. A polinomiális korrekció nem csak a mérések reprodukálhatóságát növeli, hanem megakadályozza azt is, hogy az időfüggésből származó különbségeket a minták közötti biológiai-kémiai különbségeknek tulajdonítsuk.

A korrekciós módszert protonált peptidek esetében teszteltem. A tömegspektrométerben zajló folyamatok során keletkező fragmensek és adduktionok viselkedése sokkal összetettebb lehet, és a polinomiális korrekció itt még hatékonyabbnak bizonyulhat, azonban ehhez további vizsgálatok szükségesek.

A polinomiális korrekcióhoz minden HPLC-MS méréssorozatban 3-5 mintánként referencia mintát szükséges mérni. Ennek a mintának ugyanazokat a komponenseket kell tartalmaznia, mint a valós mintáknak, az intenzitásbeli különbségek nem számítanak. Az általában használt minőségellenőrző minták, amelyek standard fehérje emésztmények, erre a célra nem megfelelőek, legegyszerűbb helyettük a mérendő minták keverékét használni. A polinomiális korrekció során minden komponenst külön-külön kell kezelni, mivel az időfüggésük egymástól eltérő lehet.

Az 5. táblázat adataiból látható, hogy a polinomiális korrekció hatására az abszolút és a relatív intenzitásokból számolt szórások is jelentősen csökkentek. A korrekciót követően az abszolút és relatív intenzitásokból számolt szórások egymástól csak nagyon kismértékben térnek el, így felmerül a kérdés, hogy a polinomiális korrekció mellett szükség van-e az adatok normálására. A normálás azonban nem csak a mérések időbeli változásából származó szórást csökkenti, hanem az egyéb mérési hibákat (pl. injektálási térfogat változása) és a minta-előkészítésből származó abszolút intenzitások eltérését is korrigálja. Ezért főként azokban a (nano-)HPLC-MS méréssorozatokban, ahol nem csak minőségellenőrző, hanem egyesével előkészített

egymástól különböző mintákat is mérünk, a polinomiális illesztést és a normálást kombinálva érdemes alkalmazni.

Azokban az esetekben, amikor nagyon hasonló mintákat mérünk, lehetséges az összes mintát felhasználni a polinom illesztésénél (nemcsak a minőségellenőrző mintákat), ilyenkor 50-70%-os korrekció érhető el. Nagyon fontos, hogy random sorrendben kell mérni a mintákat, amellyel el lehet elkerülni a biológiai különbségekből származó eltérések korrigálását.

5.5. Ionizáló sugárzás hatása a plazma fehérjék glikozilációs mintázatára

Az ionizáló sugárzás glikozilációra való hatását elsőként tanulmányoztam humán vérplazma fehérjéken. Radioterápiás kezelést megelőző ('A' minta), a kezelést befejezését közvetlenül ('B' minta), valamint 1-1,5 hónappal követően ('C' minta) vett vérplazmamintákból határoztam meg 7 fehérje helyspecifikus glikozilációs mintázatát. A kezelés közvetlen hatására az összes vizsgált fehérjénél tapasztaltam különböző változásokat ('B' minta). A változások a kezelés hosszabb távú következményeként is megfigyelhetők, azonban a mértékük kisebb, tehát a mintázatok elkezdenek visszarendeződni az eredeti állapotba ('C' minta). Az, hogy minden fehérjén találtam változásokat, más poszt-transzlációs módosításokban mért változások gyakoriságához képest nagyon kiemelkedő. Sejtekben ionizáló sugárzás hatására a kvantitatívan analizált foszfo- és acetilált proteinek 1%-a mutatott csak kétszeresnél nagyobb növekedést, és 3,5%-a másfélszereset [196].

5.5.1. Az adatok normálásának jelentősége

A közvetlenül a kezelés után vett 'B' mintákban a kiindulási 'A' mintákhoz képest a legtöbb glikoform esetében 20-30%-os intenzitásváltozást (növekedést vagy csökkenést) tapasztaltam, de előfordult kétszeresnél nagyobb változás is.

A változások mértéke nemcsak a mérési intenzitások abszolút értékének megváltozásától függ. Az abszolút értékekből számolt változások nem jellemzik megfelelően az egyes minták közti különbségeket, ezért érdemes a korrigált adatokat is normálni (lásd *5.4. fejezet*).

A normálás azonban további kérdéseket vet fel. A normált adatokból levont biológiai következtetések vagy a következtetések hátterében álló okok és jelenségek

az egyes normálási módszerektől függően más és mások lehetnek. A szervezetet érő külső hatások következtében, amelyek közül sorolható a sugárterápia is, valamint élettani és patofiziológiai állapotokban a glikoproteinek koncentrációja, a glikopeptideken mérhető glikoziláció mértéke, azaz a glikozilációs helyek betöltöttsége és a glikopeptidek helyspecifikus mintázata, tehát a glikoformok aránya is megváltozhat. Ezek a változások legtöbbször egyszerre állnak fent és általában együttesen is vizsgáljuk hatásukat, ezért az eredmények értelmezésénél körültekintően kell eljárni. [228]

A 6. táblázat azon glikoformok 'A' mintákban mért relatív intenzitásának átlagértékeit tartalmazza, amelyek elérték a kvantitatív meghatározáshoz szükséges minimális intenzitást. A relatív intenzitásértékeket a teljes kromatográfiás futásban azonosított glikoform intenzitások összegére való normálást követően kaptam. A normálásnál tehát az összes fehérjéhez tartozó összes glikoform intenzitását figyelembe vettem, így az egyes glikoformok 'A', 'B' és 'C' minták közötti különbsége az azokat tartalmazó glikoproteinek koncentrációjának, glikozilációs betöltöttségének és a helyspecifikus glikozilációs helvei mintázatának megváltozásából együttesen származik. Amennyiben az intenzitásokat a csak egy glikopeptidhez tartozó glikoform intenzitások összegére (szummára) vagy a legintenzívebb glikoform intenzitására (maximumra) normálom, akkor önmagában vizsgálható a helyspecifikus glikozilációs mintázatok változásának hatása. A 29. ábra a mérésenkénti szummára (ez a rész megegyezik a 20. ábrával) és a glikopeptidenkénti maximumra való normálást követő eredményeket mutatja a transzferrin fehérje esetében.



29. ábra A transzferrin glikozilációs mintázata a sugárterápiával kezelt betegek 'A', 'B' és 'C' mintáiban mérésenként és glikopeptidenként normálva. A glikopeptidekre való normálásnál az Asn432 és Asn630 esetében is a BiS2F0 glikoform képzi a normálás alapját, ezért e glikoformokat az alsó ábrán nem tüntettem fel.

A transzferrin Asn432 glikozilációs helyén található BiS1F0 glikoform relatív intenzitása mérésenként normálva az 'A' mintában 3,6%; a 'B' mintában 1,6%; a 'C' mintában 1,0%, tehát B/A=0,44 és C/A=0,28. Ez a fehérje koncentrációjának, a glikozilációs hely betöltöttségének és a glikozilációs mintázat megváltozásának együttes hatása. Glikopeptidenként normálva 'A': 22,1%; 'B': 14,8% és 'C': 7,7%-ot kaptam, azaz B/A=0,67 és C/A=0,35. Ez csak a glikozilációs mintázat megváltozásának hatása. A B/A és C/A értékek a mérésenkénti normálásnál kisebbek voltak a glikopeptidenkénti normálással számoltaknál. A sugárterápia hatására az intenzitások csökkentek, tehát a mérésenkénti normálással kapott kisebb (1-től távolabbi) hányadosok nagyobb mértékű csökkenést jelentenek és alátámasztják, hogy a glikoform intenzitások megváltozása a glikoprotein koncentrációjának, glikozilációs helyek betöltöttségének és helyspecifikus glikozilációs mintázatának együttes eredményeként jön létre.

5.5.2. Egér és ember minták összehasonlítása

A korábbiakban az ionizáló sugárzás glikozilációra való hatását csak egerek esetében vizsgálták. Chaze és munkatársai [201] a biantennáris szerkezetű oligoszacharidok csökkenését, valamint a tri-, tetra- és pentaantennáris szerkezetű glikánok, a fukoziláció és a szializáció növekedését figyelték meg. A biantennáris *N*-glikánok szintézisében résztvevő gének expressziójában nem találtak változásokat, azonban a multiantennáris *N*-glikánokhoz köthető gének expressziója megnőtt. A vizsgálat során a fehérjékről a glikánokat enzimatikus úton lehasították, ezt követően az oligoszacharidokat önmagukban vizsgálták, az azokat hordozó peptideket nem, tehát átlagolt mintázatot határoztak meg. A vizsgálat eredményeiből nem derül ki, hogy az egyes glikánok intenzitásában mért változás az összes adott glikán struktúrát hordozó fehérjén létrejött-e, vagy ezek a változások csak bizonyos fehérjékhez köthetők.

Az egerek vizsgálata és az általam végzett humán vizsgálatok során mindkét esetben kicsi (néhány cm²) területet sugároztak be, ami az egereknél a teljes test térfogatának kb. 10%-át tette ki, embereknél kb. 0,01%-át. Tehát az egéren mért változások teljes test, az emberi minták analízise során kapott eredmények pedig lokális besugárzás következményei. Ugyanakkor a vérplazma fehérjék

glikozilációjának változása nem a közvetlenül érintett szövetek károsodására adott direkt helyi válasz része, hanem az embereknél is szisztémás válasznak tekinthető.

További lényeges különbség volt, hogy amíg Chaze és munkatársai az egér mintákat egyszeri alkalommal történő besugárzást követően analizálták, addig az embereket rendszeresen, több alkalommal kezelték kisebb dózisú (1,8-3 Gy) sugárterápiával (a teljes dózis hasonló volt: emberek: 51-72 Gy, egerek: 20, 40, 80 Gy). Tehát én az ionizáló sugárzás akkumulált hatását vizsgáltam. Egy másik vizsgálatban Jun Ma és munkatársai [204] ugyancsak egereket sugároztak be 3-10 Gy egyszeri dózissal, és különböző mértékű és lefutású időfüggő változásokat tapasztaltak. 10 Gy dózist követően végig csökkent a glikoproteinek koncentrációja. 3 és 6 Gy besugárzását követően 7 napon át követve a glikoproteinek plazma koncentrációját több hullámban emelkedési és csökkenési fázisokat figyeltek meg, amelyet többféle egyszerre beinduló és ellentétes hatásokat kiváltó válaszreakcióval magyaráztak. A válaszreakciók az általam vizsgált rendszeres besugárzás mellett teljesen mások lehetnek, és más hatásokat hozhatnak létre, ezért további vizsgálatok tárgyát képezhetik.

A humán vizsgálatok során az összes adatot elemezve a glikoformok 56%-ánál intenzitáscsökkenést, 44%-ánál intenzitásnövekedést tapasztaltam. Összefüggéseket kerestem a változások iránya (növekedés vagy csökkenés) és a következő paraméterek között:

- a) különböző fehérjék,
- b) különböző típusú glikánok az egyes glikoformokon: antennák-, sziálsavak-, valamint fukózok száma,
- c) egyes emberek.

A paraméterek és a változások iránya között az egerekkel ellentétben semmilyen összefüggést nem találtam. Ez az emberi minták vizsgálata során még inkább igazolja a helyspecifikus mintázatok jelentőségét, és szükségessé teszi azok meghatározását minden egyes fehérje és minden egyes ember esetében. Lehasított glikánok analízisével – szerkezeti és egyedek közötti összefüggések hiányában – a kb. 50-50% -os növekedési, illetve csökkenési arány miatt nem lehetne kimutatni az ionizáló sugárzás glikozilációs mintázatra gyakorolt hatását.

6. Következtetések

Doktori munkám során a vérplazma fehérjék helyspecifikus glikozilációs mintázatának meghatározására alkalmas elválasztástechnikai, tömegspektrometriai és értékelési módszereket dolgoztam ki, illetve optimáltam. Meghatároztam a plazma nagy koncentrációban jelenlévő fehérjéinek részletes helyspecifikus glikozilációs mintázatát, és megvizsgáltam a rákos betegségek terápiájában alkalmazott ionizáló sugárzás glikozilációs mintázatokat befolyásoló hatását.

Vizsgálataimból kiderül, hogy a szokásos analitikai: 2,1 és 4,6 mm átmérőjű intakt fehérjék elválasztására alkalmas makropórusos kromatográfiás oszlopok lehetővé teszik a glikoproteomikai vizsgálatokhoz elegendő mennyiségű vérplazma frakcionálását, és egyszerre több fehérje glikozilációs mintázatának meghatározását. Az optimált kromatográfiás körülmények között az egy fehérjéhez tartozó különböző glikoformok és genetikai variánsok a fordított fázison történő elválasztáskor nem váltak el egymástól. Vizsgálataim tehát megerősítik azt a feltételezést, hogy a fehérjék fordított fázisú elválasztásában a peptidlánc tulajdonságainak van a legnagyobb szerepe, és a glikoformok kevés befolyással vannak arra. Ennek egyrészről hátránya, hogy az elválasztás hatékonysága (csúcsok felbontása) kisebb. Másrészről nagy előnye, hogy a fordított fázisú frakcionálás lehetővé teszi a glikozilációs mintázatok egy frakcióból történő meghatározását. Ez valószínűleg nem csak a glikoziláció, hanem más poszt-transzlációs módosulásokra is igaz. Egy vizsgálatban fehérjék foszforilált változatai között sem tapasztaltam elválást, azonban részletes vizsgálatokat csak a glikozilációra végeztem.

A nagy koncentrációjú vérplazma fehérjék meghatározott helyspecifikus glikozilációs mintázata az irodalomban talált mintázatokkal összehasonlítva részletesnek, néhány esetben teljesen újnak tekinthető, még szigorúbb elfogadási kritériumok mellett is. Az azonosított glikoformok száma eléri az intakt fehérjéken azonosított glikoformok számát, ami azt jelenti, hogy fehérje szinten történő további tisztítási vagy izolálási lépések beiktatása már nem szükséges. A kisebb koncentrációjú fehérjék mintázatának meghatározásához, amelyek az irodalomban egyelőre kevés esetben érhetők el, az adott fehérjéből nagyobb mennyiséget kell izolálni. Mivel a frakcionálásra használt analitikai oszlop terhelhetősége korlátozott,

DOI:10.14753/SE.2016.1923

elsősorban további nagy koncentrációjú fehérjék depletálásával lehet növelni a kisebb koncentrációjú fehérjék injektált és izolált mennyiségét. Az újonnan azonosított glikoformok, illetve teljesen új glikozilációs mintázatok közelebb vihetnek a fehérjék biológiai jelentőségének alaposabb megismeréséhez és működésük mélyebb megértéséhez. Emellett az azonosított glikoformok különböző betegségekben történő vizsgálata új, vagy a korábbiaknál szelektívebb biomarkereket eredményezhet.

A tömegspektrometriai mérések időbeli változásainak korrigálására kidolgozott negyedfokú polinom illesztésén alapuló korrekciós módszer mind ESI, mind nano-ESI ionforrások használata során igen hatékonynak bizonyult. Az illesztési paraméterek meghatározásánál és a módszer tesztelésénél olyan mintákra fókuszáltam, amelyek egymástól csak kismértékben különböznek, de ezt a kismértékű különbséget is meg kell határozni. Ilyenek a biomarker vizsgálatok, ahol a plazmaminták közti kis különbségek azonosítása a cél, és a gyógyszerészeti minőségellenőrző vizsgálatok is. A módszer az egymástól kismértékben különböző mintáknál normálással kombinálva a leghatékonyabb. A polinomiális korrekció nem csak a mérések reprodukálhatóságát növeli, hanem ugyanazon minőségellenőrző minta alkalmazása esetén lehetővé teszi az egymástól eltérő időpontokban, vagy akár különböző laboratóriumokban mért méréssorozatok összehasonlítását is.

Az ionizáló sugárzás hatására történő glikozilációs mintázatokban mért változások eredményeim alapján a glikoproteinek koncentrációjának, a glikozilációs helyek betöltöttségének és a glikoformok arányában mért eltéréseknek együttes következménye. A változások számos fehérjén megfigyelhetők, de nagyságuk az egyes fehérjék és azok glikoformjai között is eltérő. A mintázatbeli változások hosszú távúak és a kezelés befejezését követően 1-1,5 hónappal csökkent mértékben még fennállnak. Mivel a glikoziláció számos immunológiai folyamat és a sejtek közötti kommunikáció egyik lényeges eleme, a glikozilációs mintázatok megváltozása és a sugárterápiás kezelés hatékonysága, illetve mellékhatásai között fontos, eddig ismeretlen összefüggések lehetnek, amelyek felderítéséhez további, nagyobb mintaszámú vizsgálatok szükségesek.

7. Összefoglalás

A glikoziláció a fehérjék egyik leggyakoribb poszt-transzlációs módosítása, amelynek sokféle fontos biológiai és élettani szerepe van. A fehérjék glikozilációs mintázatának meghatározására napjainkban még nem állnak rendelkezésre rutinszerűen és széleskörűen alkalmazható technikák. A vérplazma nagyon komplex rendszer, amelyben a fehérjék, és főként a hozzájuk tartozó glikoformok sokfélesége óriási, és a komponensek koncentrációtartománya is nagyon széles. Emiatt a vérplazma fehérjék glikozilációs mintázatának meghatározása még inkább kihívást jelent, és az elválasztástechnikai, tömegspektrometriai, valamint bioinformatikai módszerek fejlesztésénél erre a szempontra különösen nagy hangsúlyt kell fektetni.

Doktori munkám során a vérplazma fehérjék helyspecifikus glikozilációs mintázatának meghatározására alkalmas minta-előkészítési és analitikai módszereket dolgoztam ki, illetve optimáltam, ezek közül a legfontosabbak a következők voltak: A vérplazma minták komplexitásának csökkentésére fordított fázisú kromatográfiával történő frakcionálási módszert dolgoztam ki [207]. A HPLC-MS mérések időfüggésből származó szórásának csökkentésére kidolgoztam egy negyedfokú polinomiális korrekciós módszert és igen hatékonynak találtam [214].

Meghatároztam a nagy koncentrációjú vérplazma fehérjék helyspecifikus glikozilációs mintázatát. A meghatározott glikozilációs mintázatok sok esetben az irodalomban közöltnél részletesebbek, némely fehérje esetében pedig teljesen újnak tekinthetők.

A rákos betegségekben alkalmazott sugárterápia glikozilációt befolyásoló hatását elsőként vizsgáltam humán vérplazma fehérjéken. Eredményeim azt mutatják, hogy az ionizáló sugárzás hatására a glikoproteinek koncentrációja, glikozilációs helyeinek betöltöttsége és helyspecifikus glikozilációs mintázata is megváltozik. A változások igen gyakoriak, szinte minden glikoform esetében mérhető különbségeket találtam, amelyek a sugárterápiás kezelést követően hosszabb távon is fennállnak. [215]

8. Summary

Glycosylation is one of the most common post-translational modification of proteins, it has several important biological and physiological role. Study of glycosylation pattern of proteins is difficult, and special, well-established methods need to be developed. Blood plasma samples are very complex mixtures, containing a lot of proteins and a huge number of glycoforms in wide concentration range. This makes the analysis of glycosylation patterns from blood plasma challenging, and during the development of analytical methods, like mass spectrometric analysis and application of bioinformatic techniques, the complexity of samples should be highly considered.

My aims were the development and optimization of sample preparation methods and analytical tools for the analysis of site-specific glycosylation pattern of blood plasma proteins. The main points were the following: I applied reversed phase chromatography and developed a fractionation method to reduce complexity of the samples [207]. Long-term reproducibility of HPLC-MS measurements were improved by correcting time-dependent variations using polynomial fitting [214].

I analyzed the site-specific glycosylation pattern of several blood plasma proteins. Data analysis and literature search revealed novel glycoforms and glycosylation patterns.

Effect of cancer radiotherapy on protein glycosylation was studied on human blood plasma proteins for the first time. Concentration of glycoproteins, glycosylation site occupancy and site-specific glycosylation pattern were found to change due to ionizing radiation. Nearly all studied glycoforms' quantity changed, either increasing or decreasing, and these changes last for a long time after radiotherapy. [215]

9. Irodalomjegyzék

1. Dunn MJ. (1997) From protein maps to genomes - Proceedings of the Second Siena Two-Dimensional Electrophoresis Meeting held in Siena, September 16-18, 1996. Electrophoresis, 18:U3-U4.

2. Dunn MJ. (1995) 2D Electrophoresis - From protein maps to genomes -Proceedings of the International Meeting - Siena, September 5-7, 1994. Electrophoresis, 16:U3-U4.

3. Patterson SD and Aebersold RH. (2003) Proteomics: the first decade and beyond. Nat Genet, 33:311-323.

 Zhu H, Bilgin M and Snyder M. (2003) Proteomics. Annu Rev Biochem, 72:783-812.

5. Anderson NL and Anderson NG. (1998) Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. Electrophoresis, 19:1853-1861.

6. Klose J. (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. Humangenetik, 26:231-243.

7. Scheele GA. (1975) Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. J Biol Chem, 250:5375-5385.

8. O'Farrell PH. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem, 250:4007-4021.

9. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpapoljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL and Humpherysmith I. (1995) Progress with geneproduct mapping of the mollicutes - Mycoplasma genitalium. Electrophoresis, 16:1090-1094.

10. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, HumpherySmith I, Williams KL and Hochstrasser DF. (1996) From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. Bio-Technology, 14:61-65.

 Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Blackstock W, Pappin DJ and Selby PJ. (2000) Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. Lancet, 356:1749-1756. 12. Spiro RG. (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. Glycobiology, 12:43R-56R.

13. Apweiler R, Hermjakob H and Sharon N. (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. BBA, 1473:4-8.

14. Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA and Dwek RA. (2001) Glycosylation and the immune system. Science, 291:2370-2376.

15. Ohtsubo K and Marth JD. (2006) Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. Cell, 126:855-867.

16. Marth JD and Grewal PK. (2008) Mammalian glycosylation in immunity. Nat Rev Immunol, 8:874-887.

17. Lis H and Sharon N. (1993) Protein glycosylation - structural and functionalaspects. Eur J Biochem, 218:1-27.

18. Sinclair AM and Elliott S. (2005) Glycoengineering: The effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. J Pharm Sci, 94:1626-1635.

19. Sola RJ and Griebenow K. (2009) Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. J Pharm Sci, 98:1223-1245.

20. Jefferis R. (2009) Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. Trends Pharmacol Sci, 30:356-362.

21. Reis CA, Osorio H, Silva L, Gomes C and David L. (2010) Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. J Clin Pathol, 63:322-329.

22. Drake PM, Cho W, Li B, Prakobphol A, Johansen E, Anderson NL, Regnier FE, Gibson BW and Fisher SJ. (2010) Sweetening the pot: Adding glycosylation to the biomarker discovery equation. Clin Chem, 56:223-236.

23. Shinzaki S, Kuroki E, Iijima H, Tatsunaka N, Ishii M, Fujii H, Kamada Y, Kobayashi T, Shibukawa N, Inoue T, Tsujii M, Takeishi S, Mizushima T, Ogata A, Naka T, Plevy SE, Takehara T and Miyoshi E. (2013) Lectin-based immunoassay for aberrant IgG glycosylation as the biomarker for Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis, 19:321-331.

24. Vermassen T, Van Praet C, Lumen N, Decaestecker K, Vanderschaeghe D, Callewaert N, Villeirs G, Hoebeke P, Van Belle S, Rottey S and Delanghe J. (2015) Urinary prostate protein glycosylation profiling as a diagnostic biomarker for prostate cancer. Prostate, 75:314-322.

25. Polanski M and Anderson NL. (2007) A list of candidate cancer biomarkers for targeted proteomics. Biomark insights, 1:1-48.

26. Rudd PM and Dwek RA. (1997) Glycosylation: Heterogeneity and the 3D structure of proteins. Crit Rev Biochem Mol Biol, 32:1-100.

27. Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA and Opdenakker G. (1998) Concepts and principles of O-linked glycosylation. Crit Rev Biochem Mol Biol, 33:151-208.

28. Hang HC and Bertozzi CR. (2005) The chemistry and biology of mucin-type Olinked glycosylation. Bioorg Med Chem, 13:5021-5034.

29. Oconnor SE and Imperiali B. (1996) Modulation of protein structure and function by asparagine-linked glycosylation. Chem Biol, 3:803-812.

30. Weerapana E and Imperiali B. (2006) Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. Glycobiology, 16:91R-101R.

31. Hofsteenge J, Muller DR, Debeer T, Loffler A, Richter WJ and Vliegenthart JFG. (1994) New-type of linkage between a carbohydrate and a protein - C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human Rnase Us. Biochemistry, 33:13524-13530.

32. Gilmore R. (2011) Structural biology porthole to catalysis. Nature, 474:292-293.

33. Kowarik M, Young NM, Numao S, Schulz BL, Hug I, Callewaert N, Mills DC, Watson DC, Hernandez M, Kelly JF, Wacker M and Aebi M. (2006) Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence. EMBO J, 25:1957-1966.

34. Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S and Brunak S. (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. Proteomics, 4:1633-1649.

35. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW and Etzler ME. Essentials of glycobiology, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2009.

36. Schachter H. (2000) The joys of HexNAc. The synthesis and function of N-and O-glycan branches. Glycoconjugate, J 17:465-483.

37. Geyer H and Geyer R. (2006) Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. BBA, 1764:1853-1869.

38. Imre T, Schlosser G, Pocsfalvi G, Siciliano R, Molnar-Szollosi E, Kremmer T, Malorni A and Vekey K. (2005) Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. J Mass Spectrom, 40:1472-1483.

39. Wang H and Hanash S. (2003) Multi-dimensional liquid phase based separations in proteomics. J Chromatogr B, 787:11-18.

40. Issaq HJ. (2001) The role of separation science in proteomics research. Electrophoresis, 22:3629-3638.

41. Domon B and Aebersold R. (2006) Review - Mass spectrometry and protein analysis. Science, 312:212-217.

42. Chalkley RJ, Hansen KC and Baldwin MA. Bioinformatic methods to exploit mass spectrometric data for proteomic applications. In: Burlingame AL. (ed) Methods in Enzymology, Vol. 402: Biological mass spectrometry. Elsevier, Amsterdam, 2005:289-312.

43. Gygi SP and Aebersold R. (2000) Mass spectrometry and proteomics. Curr Opin Chem Biol, 4:489-494.

44. Nice EC, Rothacker J, Weinstock J, Lim L and Catimel B. (2007) Use of multidimensional separation protocols for the purification of trace components in complex biological samples for proteomics analysis. J Chromatogr A, 1168:190-210.

45. Sandra K, Moshir M, D'Hondt F, Verleysen K, Kas K and Sandra P. (2008) Highly efficient peptide separations in proteomics - Part 1. Unidimensional high performance liquid chromatography. J Chromatogr B, 866:48-63.

46. Anderson NL and Anderson NG. (2002) The human plasma proteome - History, character, and diagnostic prospects. Mol Cell Proteomics, 1:845-867.

47. Sandra K, Moshir M, D'Hondt F, Tuytten R, Verleysen K, Kas K, Francois I and Sandra P. (2009) Highly efficient peptide separations in proteomics Part 2: Bi- and multidimensional liquid-based separation techniques. J Chromatogr B, 877:1019-1039.

48. Di Palma S, Hennrich ML, Heck AJR and Mohammed S. (2012) Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. J Proteomics, 75:3791-3813.

49. Tang J, Gao M, Deng C and Zhang X. (2008) Recent development of multidimensional chromatography strategies in proteome research. J Chromatogr B, 866:123-132.

50. Nagaraj N, Kulak NA, Cox J, Neuhauser N, Mayr K, Hoerning O, Vorm O and Mann M. (2012) System-wide perturbation analysis with nearly complete coverage of the yeast proteome by single-shot ultra HPLC runs on a bench top orbitrap. Mol Cell Proteomics, 11:1-11.

51. Liu HB, Lin DY and Yates JR. (2002) Multidimensional separations for protein/peptide analysis in the post-genomic era. Biotechniques, 32:898-902.

52. Fournier ML, Gilmore JM, Martin-Brown SA and Washburn MP. (2007) Multidimensional separations-based shotgun proteomics. Chem Rev, 107:3654-3686.

53. Link AJ. (2002) Multidimensional peptide separations in proteomics. Trends Biotechnol, 20:S8-S13.

54. Giddings JC. (1995) Sample dimensionality: A predictor of order-disorder in component peak distribution in multidimensional separation. J Chromatogr A, 703:3-15.

55. Wolters DA, Washburn MP and Yates JR. (2001) An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. Anal Chem, 73:5683-5690.

56. Udiavar S, Apffel A, Chakel J, Swedberg S, Hancock WS and Pungor E. (1998) The use of multidimensional liquid-phase separations and mass spectrometry for the detailed characterization of posttranslational modifications in glycoproteins. Anal Chem, 70:3572-3578.

57. Wuhrer M, Catalina MI, Deelder AM and Hokke CH. (2007) Glycoproteomics based on tandem mass spectrometry of glycopeptides. J Chromatogr B, 849:115-128.

58. Ohta M, Kawasaki N, Hyuga S, Hyuga M and Hayakawa T. (2001) Selective glycopeptide mapping of erythropoietin by on-line high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. J Chromatogr A, 910:1-11.

59. Wuhrer M, Deelder AM and Hokke CH. (2005) Protein glycosylation analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B, 825:124-133.

60. Madera M, Mechref Y and Novotny MV. (2005) Combining lectin microcolumns with high-resolution separation techniques for enrichment of glycoproteins and glycopeptides. Anal Chem, 77:4081-4090.
61. Berg JM, Tymoczko JL and Stryer L. Lectins are specific carbohydrate-binding proteins. In: Berg JM, Tymoczko JL and Stryer L. (eds) Biochemistry, 5th edition. W.H.Freeman & Co Ltd, New York, 2002.

62. Yang ZP and Hancock WS. (2004) Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column. J Chromatogr A, 1053:79-88.

63. Madera M, Mechref Y, Klouckova I and Novotny MV. (2006) Semiautomated high-sensitivity profiling of human blood serum glycoproteins through lectin preconcentration and multidimensional chromatography/tandem mass spectrometry. J Proteome Res, 5:2348-2363.

64. Ozohanics O, Turiak L, Drahos L and Vekey K. (2012) Comparison of glycopeptide/glycoprotein enrichment techniques. Rapid Commun Mass Spectrom, 26:215-217.

65. Ackermann BL and Berna MJ. (2007) Coupling immunoaffinity techniques with MS for quantitative analysis of low-abundance protein biomarkers. Expert Rev Proteomics, 4:175-186.

66. Whiteaker JR, Zhao L, Anderson L and Paulovich AG. (2010) An automated and multiplexed method for high throughput peptide immunoaffinity enrichment and multiple reaction monitoring mass spectrometry-based quantification of protein biomarkers. Mol Cell Proteomics, 9:184-196.

67. Koerber JT, Thomsen ND, Hannigan BT, Degrado WF and Wells JA. (2013) Nature-inspired design of motif-specific antibody scaffolds. Nat Biotechnol, 31:916-921.

Azarkan M, Huet J, Baeyens-Volant D, Looze Y and Vandenbussche G. (2007)
Affinity chromatography: A useful tool in proteomics studies. J Chromatogr B, 849:81-90.

69. Marx V. (2013) Finding the right antibody for the job. Nat Methods, 10:703-707.

70. Ma D, Baruch D, Shu Y, Yuan K, Sun Z, Ma K, Hoang T, Fu W, Min L, Lan Z-S, Wang F, Mull L and He W-W. (2012) Using protein microarray technology to screen anti-ERCC1 monoclonal antibodies for specificity and applications in pathology. BMC Biotech, 12.

71. Polaskova V, Kapur A, Khan A, Molloy MP and Baker MS. (2010) Highabundance protein depletion: Comparison of methods for human plasma biomarker discovery. Electrophoresis, 31:471-482.

72. Echan LA, Tang HY, Ali-Khan N, Lee K and Speicher DW. (2005) Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. Proteomics, 5:3292-3303.

73. Issaq HJ, Conrads TP, Janini GM and Veenstra TD. (2002) Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides. Electrophoresis, 23:3048-3061.

74. Ly L and Wasinger VC. (2011) Protein and peptide fractionation, enrichment and depletion: Tools for the complex proteome. Proteomics, 11:513-534.

75. Millea KM and Krull IS. (2003) Subproteomics in analytical chemistry: Chromatographic fractionation techniques in the characterization of proteins and peptides. J Liq Chromatogr Relat Technol, 26:2195-2224.

76. Wienkoop S, Glinski M, Tanaka N, Tolstikov V, Fiehn O and Weckwerth W, (2004) Linking protein fractionation with multidimensional monolithic reversed-phase peptide chromatography/mass spectrometry enhances protein identification from complex mixtures even in the presence of abundant proteins. Rapid Commun Mass Spectrom, 18:643-650.

77. Melchior K, Tholey A, Heisel S, Keller A, Lenhof H-P, Meese E and Huber CG. (2010) Protein- versus peptide fractionation in the first dimension of two-dimensional high-performance liquid chromatography-matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry for qualitative proteome analysis of tissue samples. J Chromatogr A, 1217:6159-6168.

78. Melchior K, Tholey A, Heisel S, Keller A, Lenhof H-P, Meese E and Huber CG. (2009) Proteomic study of human glioblastoma multiforme tissue employing complementary two-dimensional liquid chromatography- and mass spectrometry-based approaches. J Proteome Res, 8:4604-4614.

79. Eschelbach JW and Jorgenson JW. (2006) Improved protein recovery in reversedphase liquid chromatography by the use of ultrahigh pressures. Anal Chem, 78:1697-1706.

80. Canas B, Pineiro C, Calvo E, Lopez-Ferrer D and Manuel Gallardo J. (2007) Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. J Chromatogr A, 1153:235-258.

81. Bodzon-Kulakowska A, Bierczynska-Krzysik A, Dylag T, Drabik A, Suder P, Noga M, Jarzebinska J and Silberring J. (2007) Methods for samples preparation in proteomic research. J Chromatogr B, 849:1-31.

82. Capriotti AL, Cavaliere C, Foglia P, Samperi R and Lagana A. (2011) Intact protein separation by chromatographic and/or electrophoretic techniques for top-down proteomics. J Chromatogr A, 1218:8760-8776.

83. Gorg A, Weiss W and Dunn MJ. (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics, 4:3665-3685.

84. Beranova-Giorgianni S. (2003) Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. Trends Anal Chem, 22:273-281.

Rabilloud T, Vaezzadeh AR, Potier N, Lelong C, Leize-Wagner E and Chevallet
 M. (2009) Power and limitations of electrophoretic separations in proteomics strategies.
 Mass Spectrom Rev, 28:816-843.

86. Righetti PG, Castagna A, Antonioli P and Boschetti E. (2005) Prefractionation techniques in proteome analysis: The mining tools of the third millennium. Electrophoresis, 26:297-319.

87. Ahrer K and Jungbauer A. (2006) Chromatographic and electrophoretic characterization of protein variants. J Chromatogr B, 841:110-122.

88. Kakehi K, Kinoshita M, Kawakami D, Tanaka J, Sei K, Endo K, Oda Y, Iwaki M and Masuko T. (2001) Capillary electrophoresis of sialic acid-containing glycoprotein. Effect of the heterogeneity of carbohydrate chains on glycoform separation using an alpha(1)-acid glycoprotein as a model. Anal Chem, 73:2640-2647.

89. Faca V, Pitteri SJ, Newcomb L, Glukhova V, Phanstiel D, Krasnoselsky A, Zhang Q, Struthers J, Wang H, Eng J, Fitzgibbon M, McIntosh M and Hanash S. (2007) Contribution of protein fractionation to depth of analysis of the serum and plasma proteomes. J Proteome Res, 6:3558-3565.

90. Vanoss CJ. (1995) Hydrophobicity of biosurfaces—origin, quantitative determination and interaction energies. Colloids Surf B Biointerfaces, 5:91-110.

DOI:10.14753/SE.2016.1923

91. Fausnaugh JL, Kennedy LA and Regnier FE. (1984) Comparison of hydrophobicinteraction and reversed-phase chromatography of proteins. J Chromatogr, 317:141-155.

92. Krokhin OV, Craig R, Spicer V, Ens W, Standing KG, Beavis RC and Wilkins JA. (2004) An improved model for prediction of retention times of tryptic peptides in ion pair reversed-phase HPLC - Its application to protein peptide mapping by off-line HPLC-MALDI MS. Mol Cell Proteomics, 3:908-919.

93. Krokhin OV. (2006) Sequence-specific retention calculator. Algorithm for peptide retention prediction in ion-pair RP-HPLC: Application to 300-and 100-angstrom pore size C18 sorbents. Anal Chem, 78:7785-7795.

94. Mant CT, Kovacs JM, Kim H-M, Pollock DD and Hodges RS. (2009) Intrinsic amino acid side-chain hydrophilicity/hydrophobicity coefficients determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography of model peptides: comparison with other hydrophilicity/hydrophobicity scales. Biopolymers, 92:573-595.

95. Wagschal K, Tripet B, Lavigne P, Mant C and Hodges RS. (1999) The role of position a in determining the stability and oligomerization state of alpha-helical coiled coils: 20 amino acid stability coefficients in the hydrophobic core of proteins. Protein Sci, 8:2312-2329.

96. Zolotarjova N, Mrozinski P, Chen H and Martosella J. (2008) Combination of affinity depletion of abundant proteins and reversed-phase fractionation in proteomic analysis of human plasma/serum. J Chromatogr A, 1189:332-338.

97. Martosella J, Zolotarjova N, Liu HB, Nicol G and Boyes BE. (2005) Reversedphase high-performance liquid chromatographic prefractionation of immunodepleted human serum proteins to enhance mass spectrometry identification of lower-abundant proteins. J Proteome Res, 4:1522-1537.

98. Jungbauer A. (2005) Chromatographic media for bioseparation. J Chromatogr A, 1065:3-12.

99. Reh E, Hahn B and Lamotte S. (2006) Evaluation of stationary phases for 2dimensional HPLC of proteins Part 1. Validation of commercial RP-columns. J Chromatogr B, 844:204-212.

100. Skudas R, Grimes BA, Machtejevas E, Kudirkaite V, Kornysova O, Hennessy TP, Lubda D and Unger KK. (2007) Impact of pore structural parameters on column performance and resolution of reversed-phase monolithic silica columns for peptides and proteins. J Chromatogr A, 1144:72-84.

101. Hancock WS, Bishop CA, Prestidge RL, Harding DRK and Hearn MTW. (1978) Reversed-phase, high-pressure liquid chromatography of peptides and proteins with ionpairing reagents. Science, 200:1168-1170.

102. Stoeckli M, Staab D, Staufenbiel M, Wiederhold KH and Signor L. (2002) Molecular imaging of amyloid beta peptides in mouse brain sections using mass spectrometry. Anal Biochem, 311:33-39.

103. Jespersen S, Niessen WMA, Tjaden UR, Vandergreef J, Litborn E, Lindberg U and Roeraade J. (1994) Attomole detection of proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with the use of picolitre vials. Rapid Commun Mass Spectrom, 8:581-584.

104. Aebersold R and Mann M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. Nature, 422:198-207.

105. Cravatt BF, Simon GM and Yates JR, III. (2007) The biological impact of massspectrometry-based proteomics. Nature, 450:991-1000.

106. Gstaiger M and Aebersold R. (2009) Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. Nat Rev Genet, 10:617-627.

107. Kocher T and Superti-Furga G. (2007) Mass spectrometry-based functional proteomics: from molecular machines to protein networks. Nat Methods, 4:807-815.

108. Bensimon A, Heck AJR and Aebersold R. (2012) Mass Spectrometry-Based Proteomics and Network Biology. Annu Rev Biochem, 81:379-405.

109. Aebersold R and Goodlett DR. (2001) Mass spectrometry in proteomics. Chem Rev, 101:269-295.

110. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF and Whitehouse CM. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science, 246:64-71.

111. Yates JR. (2000) Mass spectrometry - from genomics to proteomics. Trends Genet, 16:5-8.

112. de Hoffmann E and Stroobant V. Mass spectrometry: Principles and applications,3rd edition. Wiley, New York, 2007.

113. Paul W and Steinwedel H. (1953) Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. Z Naturforsch A Phys, 8:448-448.

114. Wollnik H. (1993) Time-of-flight mass analyzers. Mass Spectrom Rev, 12:89-114.

115. Shen YF, Zhao R, Berger SJ, Anderson GA, Rodriguez N and Smith RD. (2002) High-efficiency nanoscale liquid chromatography coupled on-line with mass spectrometry using nanoelectrospray ionization for proteomics. Anal Chem, 74:4235-4249.

116. Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T and Mann M. (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nanoelectrospray mass spectrometry. Nature, 379:466-469.

117. Cech NB and Enke CG. (2001) Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. Mass Spectrom Rev, 20:362-387.

118. Nemes P, Marginean I and Vertes A. (2007) Spraying mode effect on droplet formation and ion chemistry in electrosprays. Anal Chem, 79:3105-3116.

119. Nemes P, Goyal S and Vertes A. (2008) Conformational and noncovalent complexation changes in proteins during electrospray ionization. Anal Chem, 80:387-395.

120. Sandin M, Teleman J, Malmstrom J and Levander F. (2014) Data processing methods and quality control strategies for label-free LC-MS protein quantification. BBA, 1844:29-41.

121. Webb-Robertson B-JM, Matzke MM, Jacobs JM, Pounds JG and Waters KM. (2011) A statistical selection strategy for normalization procedures in LC-MS proteomics experiments through dataset-dependent ranking of normalization scaling factors. Proteomics, 11:4736-4741.

122. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH and Aebersold R. (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. Nat Biotechnol, 17:994-999.

 Redestig H, Fukushima A, Stenlund H, Moritz T, Arita M, Saito K and Kusano
 M. (2009) Compensation for systematic cross-contribution improves normalization of mass spectrometry based metabolomics data. Anal Chem, 81:7974-7980.

124. Zelena E, Dunn WB, Broadhurst D, Francis-McIntyre S, Carroll KM, Begley P, O'Hagan S, Knowles JD, Halsall A, Wilson ID, Kellt DB and Consortium H. (2009) Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-term metabolomic study of human serum. Anal Chem, 81:1357-1364.

125. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, Brown M, Knowles JD, Halsall A, Haselden JN, Nicholls AW, Wilson ID, Kell DB, Goodacre R and Human Serum Metabolome HC. (2011) Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Nat Protoc, 6:1060-1083.

126. Kamleh MA, Ebbels TMD, Spagou K, Masson P and Want EJ. (2012) Optimizing the use of quality control samples for signal drift correction in large-scale urine metabolic profiling studies. Anal Chem, 84:2670-2677.

127. Wang S-Y, Kuo C-H and Tseng YJ. (2013) Batch normalizer: A fast total abundance regression calibration method to simultaneously adjust batch and injection order effects in liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry-based metabolomics data and momparison with current calibration methods. Anal Chem, 85:1037-1046.

128. Kuligowski J, Perez-Guaita D, Lliso I, Escobar J, Leon Z, Gombau L, Solberg R, Saugstad OD, Vento M and Quintas G. (2014) Detection of batch effects in liquid chromatography-mass spectrometry metabolomic data using guided principal component analysis. Talanta, 130:442-448.

129. Bogdanov B and Smith RD. (2005) Proteomics by FTICR mass spectrometry: Top down and bottom up. Mass Spectrom Rev, 24:168-200.

130. Davidson GR, Armstrong SD and Beynon RJ. Positional proteomics at the Nterminus as a means of proteome simplification In: Gevaert K and Vandekerckhove J. (eds) Methods in Molecular Biology, Vol. 753: Gel-free proteomics. Humana Press, New York, 2011: 229-242.

131. Resjo S, Berger K, Fex M and Hansson O. (2008) Proteomic studies in animal models of diabetes. Proteom Clin Appl, 2:654-669.

132. Ge Y, Lawhorn BG, ElNaggar M, Strauss E, Park JH, Begley TP and McLafferty FW. (2002) Top down characterization of larger proteins (45 kDa) by electron capture dissociation mass spectrometry. J Am Chem Soc, 124:672-678.

133. Zabrouskov V and Whitelegge JP. (2007) Increased coverage in the transmembrane domain with activated-ion electron capture dissociation for top-down Fourier-transform mass spectrometry of integral membrane proteins. J Proteome Res, 6:2205-2210.

134. Han X, Aslanian A and Yates JR, III. (2008) Mass spectrometry for proteomics.Curr Opin Chem Biol, 12:483-490.

135. Kelleher NL, Lin HY, Valaskovic GA, Aaserud DJ, Fridriksson EK and McLafferty FW. (1999) Top down versus bottom up protein characterization by tandem high-resolution mass spectrometry. J Am Chem Soc, 121:806-812.

136. Wu S, Lourette NM, Tolic N, Zhao R, Robinson EW, Tolmachev AV, Smith RD and Pasa-Tolic L. (2009) An integrated top-down and bottom-up strategy for broadly characterizing protein isoforms and modifications. J Proteome Res, 8:1347-1357.

137. Liu X, Dekker LJM, Wu S, Vanduijn MM, Luider TM, Tolic N, Kou Q, Dvorkin M, Alexandrova S, Vyatkina K, Pasa-Tolic L and Pevzner PA. (2014) De novo protein sequencing by combining top-down and bottom-up tandem mass spectra. J Proteome Res, 13:3241-3248.

138. Pappin DJC, Hojrup P and Bleasby AJ. (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. Curr Biol, 3:327-332.

139. Henzel WJ, Watanabe C and Stults JT. (2003) Protein identification: The origins of peptide mass fingerprinting. J Am Soc Mass Spectrom, 14:931-942.

140. Yang W, Steen H and Freeman MR. (2008) Proteomic approaches to the analysis of multiprotein signaling complexes. Proteomics, 8:832-851.

141. Dancik V, Addona TA, Clauser KR, Vath JE and Pevzner PA. (1999) De novo peptide sequencing via tandem mass spectrometry. J Comput Biol, 6:327-342.

142. Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM and Cottrell JS. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis, 20:3551-3567.

143. Apweiler R, Bairoch A and Wu CH. (2004) Protein sequence databases. Curr Opin Chem Biol, 8:76-80.

144. Burlingame AL, Carr SA, Bradshaw RA and Chalkley RJ. (2015) On Credibility, Clarity, and Compliance. Mol Cell Proteomics, 14:1731-1733.

145. Roepstorff P and Fohlman J. (1984) Letter to the editors. Biol Mass Spectrom, 11:601.

146. Wells JM and McLuckey SA. Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. In: Burlingame AL. (ed) Methods in Enzymology, Vol. 402: Biological mass spectrometry. Elsevier, Amsterdam, 2005:148-185.

147. Huang Y, Tseng GC, Yuan S, Pasa-Tolic L, Lipton MS, Smith RD and Wysocki VH. (2008) A data-mining scheme for identifying peptide structural motifs responsible for different MS/MS fragmentation intensity patterns. J Proteome Res, 7:70-79.

148. DeGnore JP and Qin J. (1998) Fragmentation of phosphopeptides in an ion trap mass spectrometer. J Am Soc Mass Spectrom, 9:1175-1188.

149. Falick AM, Hines WM, Medzihradszky KF, Baldwin MA and Gibson BW. (1993) Low-mass ions produced from peptides by high-energy collision-induced dissociation in tandem mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom, 4:882-893.

150. Helsens K, Martens L, Vandekerckhove J and Gevaert K. Mass spectrometrydriven proteomics: An introduction. In: Gevaert K and Vandekerckhove J. (eds) Methods in Molecular Biology, Vol. 753: Gel-free proteomics. Humana Press, New York, 2011:1-27.

151. Syka JEP, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J and Hunt DF. (2004) Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. PNAS, 101:9528-9533.

152. Zubarev RA, Kelleher NL and McLafferty FW. (1998) Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process. J Am Chem Soc, 120:3265-3266.

153. Good DM, Wirtala M, McAlister GC and Coon JJ. (2007) Performance characteristics of electron transfer dissociation mass spectrometry. Mol Cell Proteomics, 6:1942-1951.

154. McLafferty FW, Horn DM, Breuker K, Ge Y, Lewis MA, Cerda B, Zubarev RA and Carpenter BK. (2001) Electron capture dissociation of gaseous multiply charged ions by Fourier-transform ion cyclotron resonance. J Am Soc Mass Spectrom, 12:245-249.

155. Swaney DL, McAlister GC and Coon JJ. (2008) Decision tree-driven tandem mass spectrometry for shotgun proteomics. Nat Methods, 5:959-964.

156. Udeshi ND, Shabanowitz J, Hunt DF and Rose KL. (2007) Analysis of proteins and peptides on a chromatographic timescale by electron-transfer dissociation MS. FEBS J, 274:6269-6276.

157. Morelle W and Michalski J-C. (2007) Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. Nat Protoc, 2:1585-1602.

158. Kaji H, Yamauchi Y, Takahashi N and Isobe T. (2006) Mass spectrometric identification of N-linked glycopeptides using lectin-mediated affinity capture and glycosylation site-specific stable isotope tagging. Nat Protoc, 1:3019-3027.

159. Harvey DJ. (2005) Proteomic analysis of glycosylation: structural determination of N- and O-linked glycans by mass spectrometry. Expert Rev Proteomics, 2:87-101.

160. Kang P, Mechref Y, Klouckova I and Novotny MV. (2005) Solid-phase permethylation of glycans for mass spectrometric analysis. Rapid Commun Mass Spectrom, 19:3421-3428.

161. Zhang H, Li XJ, Martin DB and Aebersold R. (2003) Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. Nat Biotechnol, 21:660-666.

162. Kaji H, Saito H, Yamauchi Y, Shinkawa T, Taoka M, Hirabayashi J, Kasai K, Takahashi N and Isobe T. (2003) Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins. Nat Biotechnol, 21:667-672.

163. Lochnit G and Geyer R. (2004) An optimized protocol for nano-LC-MALDI-TOF-MS coupling for the analysis of proteolytic digests of glycoproteins. Biomed Chromatogr, 18:841-848.

164. Kurogochi M and Nishimura SI. (2004) Structural characterization of N-glycopeptides by matrix-dependent selective fragmentation of MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry. Anal Chem, 76:6097-6101.

165. Krenyacz J, Drahos L and Vekey K. (2009) Collision energy and cone voltage optimisation for glycopeptide analysis. Eur J Mass Spectrom, 15:361-365.

166. Domon B and Costello CE. (1988) A Systematic Nomenclature for CarbohydrateFragmentations in FAB-MS MS Spectra of Glycoconjugates. Glycoconjugate J, 5:397-409.

DOI:10.14753/SE.2016.1923

167. Wang F, Nakouzi A, Angeletti RH and Casadevall A. (2003) Site-specific characterization of the N-linked oligosaccharides of a murine immunoglobulin M by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. Anal Biochem, 314:266-280.

168. Demelbauer UM, Zehl M, Plematl A, Allmaier G and Rizzi A. (2004) Determination of glycopeptide structures by multistage mass spectrometry with lowenergy collision-induced dissociation: comparison of electrospray ionization quadrupole ion trap and matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap reflectron time-of-flight approaches. Rapid Commun Mass Spectrom, 18:1575-1582.

169. Harazono A, Kawasaki N, Itoh S, Hashii N, Ishii-Watabe A, Kawanishi T and Hayakawa T. (2006) Site-specific N-glycosylation analysis of human plasma ceruloplasmin using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. Anal Biochem, 348:259-268.

170. Hart-Smith G and Raftery MJ. (2012) Detection and characterization of low abundance glycopeptides via higher-energy C-Trap dissociation and orbitrap mass analysis. J Am Soc Mass Spectrom, 23:124-140.

171. Wuhrer M, Balog CIA, Koeleman CAM, Deelder AM and Hokke CH. (2005) New features of site-specific horseradish peroxidase (HRP) glycosylation uncovered by nano-LC-MS with repeated ion-isolation/fragmentation cycles. BBA, 1723:229-239.

172. Itoh S, Kawasaki N, Harazono A, Hashii N, Matsuishi Y, Kawanishi T and Hayakawa T. (2005) Characterization of a gel-separated unknown glycoprotein by liquid chromatography/multistage tandem mass spectrometry - Analysis of rat brain Thy-1 separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J Chromatogr A, 1094:105-117.

173. Hogan JM, Pitteri SJ, Chrisman PA and McLuckey SA. (2005) Complementary structural information from a tryptic N-linked glycopeptide via electron transfer ion/ion reactions and collision-induced dissociation. J Proteome Res, 4:628-632.

174. Singh C, Zampronio CG, Creese AJ and Cooper HJ. (2012) Higher energy collision dissociation (HCD) product ion-triggered electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry for the analysis of N-linked glycoproteins. J Proteome Res, 11:4517-4525.

175. Kjeldsen F, Haselmann KF, Budnik BA, Sorensen ES and Zubarev RA. (2003) Complete characterization of posttranslational modification sites in the bovine milk protein PP3 by tandem mass spectrometry with electron capture dissociation as the last stage. Anal Chem, 75:2355-2361.

176. Alley WR, Jr., Mechref Y and Novotny MV. (2009) Characterization of glycopeptides by combining collision-induced dissociation and electron-transfer dissociation mass spectrometry data. Rapid Commun Mass Spectrom, 23:161-170.

177. Cooper CA, Gasteiger E and Packer NH. (2001) GlycoMod - A software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data. Proteomics, 1:340-349.

178. An HJ, Tillinghast JS, Woodruff DL, Rocke DM and Lebrilla CB. (2006) A new computer program (GlycoX) to determine simultaneously the glycosylation sites and oligosaccharide heterogeneity of glycoproteins. J Proteome Res, 5:2800-2808.

179. Ozohanics O, Krenyacz J, Ludanyi K, Pollreisz F, Vekey K and Drahos L. (2008) GlycoMiner: a new software tool to elucidate glycopeptide composition. Rapid Commun Mass Spectrom, 22:3245-3254.

180. von der Lieth CW, Lutteke T and Frank M. (2006) The role of informatics in glycobiology research with special emphasis on automatic interpretation of MS spectra. BBA, 1760:568-577.

181. Tapio S. Ionizing radiation effects on cells, organelles and tissues on proteomelevel. In: Leszczynski D. (ed) Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol.990: Radiation proteomics. Springer, New York, 2013:37-48.

182. Azimzadeh O, Atkinson MJ and Tapio S. (2014) Proteomics in radiation research: present status and future perspectives. Radiat Environ Biophys, 53:31-38.

183. Tapio S, Hornhardt S, Gomolka M, Leszczynski D, Posch A, Thalhammer S and Atkinson MJ. (2010) Use of proteomics in radiobiological research: current state of the art. Radiat Environ Biophys, 49:1-4.

184. Leszczynski D. (2014) Radiation proteomics: A brief overview. Proteomics, 14:481-488.

185. Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A, Panayiotidis MI and Franco R. (2011) DNA damage and autophagy. Mutat Res-Fund Mol M, 711:158-166.

186. Ward JF. (1988) DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 35:95-125.

187. Goodhead DT. (1994) Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. Int J Radiat Biol, 65:7-17.

188. Nikjoo H, O'Neill P, Wilson WE and Goodhead DT. (2001) Computational approach for determining the spectrum of DNA damage induced by ionizing radiation. Radiat Res, 156:577-583.

189. Rydberg B. (1996) Clusters of DNA damage induced by ionizing radiation:
Formation of short DNA fragments, 2. Experimental detection. Radiat Res, 145:200-209.
190. Menard C, Johann D, Lowenthal M, Muanza T, Sproull M, Ross S, Gulley J,
Petricoin E, Coleman CN, Whiteley G, Liotta L and Camphausen K. (2006) Discovering clinical biomarkers of ionizing radiation exposure with serum proteomic analysis. Cancer Res, 66:1844-1850.

191. Marchetti F, Coleman MA, Jones IM and Wyrobek AJ. (2006) Candidate protein biodosimeters of human exposure to ionizing radiation. Int J Radiat Biol, 82:605-639.

192. Lacombe J, Azria D, Mange A and Solassol J. (2013) Proteomic approaches to identify biomarkers predictive of radiotherapy outcomes. Expert Rev Proteomics, 10:33-42.

193. Guipaud O, Vereycken-Holler V, Vinh J and Benderitter M. (2005) Identification of differentially expressed proteins in serums of skin-irradiated mice; Characterization of potential ionising radiation biomarkers. Mol Cell Proteomics, 4:S150-S150.

194. Deperas-Kaminska M, Bajinskis A, Marczyk M, Polanska J, Wersall P, Lidbrink E, Ainsbury EA, Guipaud O, Benderitter M, Haghdoost S and Wojcik A. (2014) Radiation-induced changes in levels of selected proteins in peripheral blood serum of breast cancer patients as a potential triage biodosimeter for large-scale radiological emergencies. Health Phys, 107:555-563.

195. Yang F, Waters KM, Webb-Robertson B-J, Sowa MB, von Neubeck C, Aldrich JT, Markillie LM, Wirgau RM, Gritsenko MA, Zhao R, Camp DG, II, Smith RD and Stenoien DL. (2012) Quantitative phosphoproteomics identifies filaggrin and other targets of ionizing radiation in a human skin model. Exp Dermatol, 21:352-357.

196. Beli P, Lukashchuk N, Wagner SA, Weinert BT, Olsen JV, Baskcomb L, Mann M, Jackson SP and Choudhary C. (2012) Proteomic Investigations Reveal a Role for RNA Processing Factor THRAP3 in the DNA Damage Response. Mol Cell, 46:212-225.

197. Winter D, Seidler J, Ziv-Lehrman S, Shiloh Y and Lehmann WD. (2009) Simultaneous identification and quantification of proteins by differential O-16/O-18 labeling and UPLC-MS/MS applied to mouse cerebellar phosphoproteome following irradiation. Anticancer Res, 29:4949-4958.

198. Povlsen LK, Beli P, Wagner SA, Poulsen SL, Sylvestersen KB, Poulsen JW, Nielsen ML, Bekker-Jensen S, Mailand N and Choudhary C. (2012) Systems-wide analysis of ubiquitylation dynamics reveals a key role for PAF15 ubiquitylation in DNA-damage bypass. Nat Cell Biol, 14:1089-1098.

199. Azimzadeh O, Scherthan H, Sarioglu H, Barjaktarovic Z, Conrad M, Vogt A, Calzada-Wack J, Neff F, Aubele M, Buske C, Atkinson MJ and Tapio S. (2011) Rapid proteomic remodeling of cardiac tissue caused by total body ionizing radiation. Proteomics, 11:3299-3311.

200. Azimzadeh O, Sievert W, Sarioglu H, Yentrapalli R, Barjaktarovic Z, Sriharshan A, Ueffing M, Janik D, Aichler M, Atkinson MJ, Multhoff G and Tapio S. (2013) PPAR Alpha: A Novel Radiation Target in Locally Exposed Mus musculus Heart Revealed by Quantitative Proteomics. J Proteome Res, 12:2700-2714.

201. Chaze T, Slomianny M-C, Milliat F, Tarlet G, Lefebvre-Darroman T, Gourmelon P, Bey E, Benderitter M, Michalski J-C and Guipaud O. (2013) Alteration of the Serum N-glycome of Mice Locally Exposed to High Doses of Ionizing Radiation. Mol Cell Proteomics, 12:283-301.

202. Lee M, Lee HJ, Seo WD, Park KH and Lee YS. (2010) Sialylation of integrin beta1 is involved in radiation-induced adhesion and migration in human colon cancer cells. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 76:1528-1536.

203. Lee M, Lee HJ, Bae S and Lee YS. (2008) Protein sialylation by sialyltransferase involves radiation resistance. Mol Cancer Res, 6:1316-1325.

204. Ma J, Han DP, Zhang M, Chen C, Zhang BR, Zhang ZH, Wang XH, Yang SM, Guo YS, Okunieff P and Zhang LR. Alteration of plasma galactose/N-acetylgalactosamine level after irradiation. In: Welch WJ, Palm F, Bruley DF and Harrison DK. (eds) Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 765: Oxygen transport to tissue XXXIV. Springer, New York, 2013:147-153.

205. Guipaud O, Holler V, Buard V, Tarlet G, Royer N, Vinh J and Benderitter M. (2007) Time-course analysis of mouse serum proteome changes following exposure of the skin to ionizing radiation. Proteomics, 7:3992-4002.

206. Ozohanics O, Turiak L, Puerta A, Vekey K and Drahos L. (2012) Highperformance liquid chromatography coupled to mass spectrometry methodology for analyzing site-specific N-glycosylation patterns. J Chromatogr A, 1259:200-212.

207. Toth E, Ozohanics O, Bobaly B, Gomory A, Jeko A, Drahos L and Vekey K. (2014) HPLC enrichment/isolation of proteins for post-translational modification studies from complex mixtures. J Pharm Biomed Anal, 98:393-400.

208. Nice EC and Aguilar MI. HPLC of peptides and proteins. In: Aguilar MI. (ed) Methods in Molecular Biology, Vol. 251. Humana Press, New York, 2004:3-8.

209. Schönfeld DL, Ravelli RBG, Mueller U and Skerra A. (2008) The 1.8-Å crystal structure of α 1-acid glycoprotein (orosomucoid) solved by UV RIP reveals the broad drug-binding activity of this human plasma lipocalin. J Mol Biol, 384:393-405.

210. Turiak L, Ozohanics O, Marino F, Drahos L and Vekey K. (2011) Digestion protocol for small protein amounts for nano-HPLC-MS(MS) analysis. J Proteomics, 74:942-947.

211. Deak NA, Murphy PA and Johnson LA. (2006) Effects of reducing agent concentration on soy protein fractionation and functionality. J Food Sci, 71:C200-C208.

212. Minkiewicz O, Dziuba J and Niklewicz M. (2005) Protein homogeneity testing by reversed-phase high-performance liquid chromatography of reduced and non-reduced samples. Polimery, 50:379-382.

213. Bozovic A and Kulasingam V. (2013) Quantitative mass spectrometry-based assay development and validation: From small molecules to proteins. Clin Biochem, 46:444-455.

214. Toth E, Hever H, Ozohanics O, Telekes A, Vekey K and Drahos L. (2015) Simple correction improving long-term reproducibility of HPLC–MS. J Mass Spectrom, 50:1130-1135.

215. Toth E, Vekey K, Ozohanics O, Jeko A, Dominczyk I, Widlak P and Drahos L.(2016) Changes of protein glycosylation in the course of radiotherapy. J Pharm Biomed Anal, 118:380-386.

216. Harazono A, Kawasaki N, Itoh S, Hashii N, Matsuishi-Nakajima Y, Kawanishi T and Yamaguchi T. (2008) Simultaneous glycosylation analysis of human serum glycoproteins by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J Chromatogr B, 869:20-30.

217. Pompach P, Chandler KB, Lan R, Edwards N and Goldman R. (2012) Semiautomated identification of N-glycopeptides by hydrophilic interaction chromatography, nano-reverse-phase LC-MS/MS, and glycan database search. J Proteome Res, 11:1728-1740.

218. Chandler KB, Pompach P, Goldman R and Edwards N. (2013) Exploring Site-Specific N-Glycosylation Microheterogeneity of Haptoglobin Using Glycopeptide CID Tandem Mass Spectra and Glycan Database Search. J Proteome Res, 12:3652-3666.

219. Wang D, Hincapie M, Rejtar T and Karger BL. (2011) Ultrasensitive characterization of site-specific glycosylation of affinity-purified haptoglobin from lung cancer patient plasma using 10 mu m i.d. porous layer open tubular liquid chromatography-linear ion trap collision-induced dissociation/electron transfer dissociation mass spectrometry. Anal Chem, 83:2029-2037.

220. Fujimura T, Shinohara Y, Tissot B, Pang P-C, Kurogochi M, Saito S, Arai Y, Sadilek M, Murayama K, Dell A, Nishimura S-T and Hakomori S-I. (2008) Glycosylation status of haptoglobin in sera of patients with prostate cancer vs. benign prostate disease or normal subjects. Int J Cancer, 122:39-49.

221. Zhang S, Jiang K, Sun C, Lu H and Liu Y. (2013) Quantitative analysis of sitespecific N-glycans on sera haptoglobin beta chain in liver diseases. Acta Biochim Biophy Sin, 45:1021-1029.

222. Pompach P, Brnakova Z, Sanda M, Wu J, Edwards N and Goldman R. (2013) Site-specific glycoforms of haptoglobin in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Mol Cell Proteomics, 12:1281-1293.

223. Maresca B, Cigliano L, Spagnuolo MS, Dal Piaz F, Corsaro MM, Balato N, Nino M, Balato A, Ayala F and Abrescia P. (2012) Differences between the glycosylation patterns of haptoglobin isolated from skin scales and plasma of psoriatic patients. Plos One 7.

224. Scruggs SB, Reisdorph R, Armstrong ML, Warren CM, Reisdorph N, Solaro RJ and Buttrick PM. (2010) A novel, in-solution separation of endogenous cardiac sarcomeric proteins and identification of distinct charged variants of regulatory light chain. Mol Cell Proteomics, 9:1804-1818.

225. Wang H, Wong C-H, Chin A, Taguchi A, Taylor A, Hanash S, Sekiya S, Takahashi H, Murase M, Kajihara S, Iwamoto S and Tanaka K. (2011) Integrated mass spectrometry-based analysis of plasma glycoproteins and their glycan modifications. Nat Protoc 6.

226. Aldredge D, An HJ, Tang N, Waddell K and Lebrilla CB. (2012) Annotation of a Serum N-Glycan Library for Rapid Identification of Structures. J Proteome Res, 11:1958-1968.

227. Shah B, Jiang XG, Chen L and Zhang Z. (2014) LC-MS/MS peptide mapping with automated data processing for routine profiling of N-glycans in immunoglobulins. J Am Soc Mass Spectrom, 25:999-1011.

228. Mayampurath A, Song E, Mathur A, Yu C-y, Harnmoud Z, Mechref Y and Tang H. (2014) Label-free glycopeptide quantification for biomarker discovery in human sera. J Proteome Res, 13:4821-4832.

229. Silva JC, Denny R, Dorschel CA, Gorenstein M, Kass IJ, Li G-Z, McKenna T, Nold MJ, Richardson K, Young P and Geromanos S. (2005) Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. Anal Chem, 77:2187-2200.

230. Morelle W, Canis K, Chirat F, Faid V and Michalski J-C. (2006) The use of mass spectrometry for the proteomic analysis of glycosylation. Proteomics, 6:3993-4015.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

Toth E, Ozohanics O, Bobaly B, Gomory A, Jeko A, Drahos L and Vekey K. (2014) HPLC enrichment/isolation of proteins for post-translational modification studies from complex mixtures. J Pharm Biomed Anal, 98:393-400. IF (2014): 2,979 10.1016/j.jpba.2014.06.025

Toth E, Hever H, Ozohanics O, Telekes A, Vekey K and Drahos L. (2015) Simple correction improving long-term reproducibility of HPLC–MS. J Mass Spectrom, 50:1130-1135. IF (2014): 2,379 10.1002/jms.3629

Toth E, Vekey K, Ozohanics O, Jeko A, Dominczyk I, Widlak P and Drahos L. (2016) Changes of protein glycosylation in the course of radiotherapy. J Pharm Biomed Anal, 118:380-386. IF (2014): 2,979 10.1016/j.jpba.2015.11.010

10.2. Egyéb közlemények

Vekey K, Ozohanics O, **Toth E,** Jeko A, Revesz A, Krenyacz J and Drahos L. (2013) Fragmentation characteristics of glycopeptides. Int J Mass Spectrom, 345-347:71-79. IF (2013): 2,227 10.1016/j.ijms.2012.08.031

Bobaly B, **Toth E,** Drahos L, Zsila F, Visy J, Fekete J and Vekey K. (2014) Influence of acid-induced conformational variability on protein separation in reversed phase high performance liquid chromatography. J Chromatogr A, 1325:155-162. IF (2014): 4,169 10.1016/j.chroma.2013.12.022

Krajsovszky G, **Toth E** and Ludanyi K. (2014) Tandem mass spectrometric study of annelation isomers of the novel thieno[3',2':4,5]pyrido[2,3-d]pyridazine ring system. ARKIVOC, 5:158-169. IF (2014): 1,165 10.3998/ark.5550190.0015.500

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek prof. dr. Vékey Károlynak, aki az MTA Természettudományi Kutatóközpont Műszercentrumának vezetője, a kutatási téma megválasztásáért, rengeteg szakmai tanácsáért, a publikálás során nyújtott segítségéért, valamint a kutatás anyagi forrásainak biztosításáért.

Köszönettel tartozom dr. Drahos Lászlónak, az MTA Természettudományi Kutatóközpont MS Proteomika kutatócsoport vezetőjének, a sok segítségéért és köszönöm, hogy munkámat a kutatócsoportban végezhettem.

Köszönöm dr. Ozohanics Olivérnek a sok szakmai tanácsát és külön köszönöm, hogy megtanított a laboratóriumi gyakorlati munkára, a műszerek és szoftverek kezelésére.

Köszönöm az MS Proteomika kutatócsoport és a Műszercentrum jelenlegi és volt munkatársainak: dr. Abrankó Lászlónak, dr. Bobály Balázsnak, Gömöry Ágnesnek, Jekő Anitának, dr. Rokobné dr. Révész Ágnesnek, dr. Turiák Lillának és Újszászy Kálmánnak a segítségét és támogatását.

Köszönettel tartozom Hevér Helgának, a Richter Gedeon Nyrt. Szerkezetkutatási Osztályán végzett tömegspektrometriai mérésekért.

Köszönettel tartozom az előbírálóknak: dr. Schlosser Gittának és dr. Janáky Tamásnak a doktori értekezéssel kapcsolatos hasznos megjegyzéseikért és észrevételeikért.

Köszönetet szeretnék mondani dr. Szabó Évának, az Egis Gyógyszergyár Zrt. munkatársának, szakdolgozati témavezetőmnek, aki megismertetett a tömegspektrometria alapjaival.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem, Doktori Iskola vezetőségének és titkárságának, hogy lehetővé tették, hogy tanulmányaimat a Gyógyszertudományok Doktori Iskolában folytathassam.

Szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak a sok bíztatásukért és türelmükért, és köszönöm a szüleimnek, hogy támogató hátteret teremtettek a munkámhoz.

Legfőképpen szeretném megköszönni Istennek, hogy ismerhetem őt, és hogy erőt és kitartást adott, és végig vezetett.