

Kvantitatív proteomikai analízisek: az adatfüggetlen adatgyűjtéstől a célzott mérésekig

Kecskeméti Gábor

Ph.D. Tézis Összefoglaló



Témavezetők:

Prof. Dr. Janáky Tamás

Dr. Szabó Zoltán

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Orvosi Vegytani Intézet

Szegedi Tudományegyetem

Szeged, Magyarország

2022

1. Bevezetés

Az elválasztási és tömegspektrometriai módszerek fejlődésének köszönhetően a folyadékromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (LC-MS) a proteomika alapvető analitikai eszközévé vált. A proteomika feladata a proteom jellemzése, beleértve a fehérjék expresszióját, funkcióját, szerkezetét, módosításait és kölcsönhatásait. A proteomika kulcsfontosságú szerepet játszik a különböző betegségek korai felismerésében, előrejelzésében lefolyásuk nyomon követésében, valamint a gyógyszerfejlesztésben is. A megfelelő MS/MS adatgyűjtési technika kiválasztásához kompromisszumokat kell kötni az idő, a reprodukálhatóság és a minta fehérjeösszetételének vizsgálati mélysége között. A proteomikai vizsgálatok során a legszélesebb körben alkalmazott adatgyűjtési stratégia az adatfüggő adatgyűjtés (DDA), amikor a tömegspektrométer egy adott ciklusban abból a választott számú legintenzívebb ionból készít MS/MS spektrumokat, melyek megfelelnek az előre beállított kritériumoknak. Ez a mérési mód alkalmas a proteom átfogó vizsgálatára, azonban a mennyiségi meghatározás csak prekursor szinten (MS1) lehetséges. Kevesebb peptid vizsgálatára azonban MS1-alapú (SIM) és a fragmens (MS2)-alapú (SRM, MRM és PRM) célzott módszerek is használhatók. Számos esetben az MS1 jel nem elég specifikus és interferenciákat tartalmazhat, viszont a peptidek MS2 ionjainak használatával lényegesen jobb jel-zaj arány érhető el, ami sokkal szelektívebb és specifikusabb adatgyűjtést tesz lehetővé. Az adatfüggetlen adatgyűjtés (DIA) a DDA és a PRM módszerek egyfajta kombinációja. Célja a minta legátfogóbb szintű vizsgálata a DDA-nál jobb reprodukálhatósággal és MS2-alapú mennyiségi meghatározással. A módszer egyik legnagyobb kihívását a széles prekursor izolációs ablak jelenti, azonban a modern műszereknek és technikáknak köszönhetően ez egyre kevésbé jelent problémát.

Egy szokványos peptidalapú (bottom-up) proteomikai munkafolyamat minden lépése lényeges, de a mintaelőkészítés különösen fontos, hiszen az egyik legnagyobb mértékben ez befolyásolja a végeredményt. Mivel a fehérjék izolálása, extrakciója és az alkalmazott emésztési protokoll is jelentősen befolyásolja az adott minta peptidösszetételét, ezek vizsgálata és optimalizálása kulcsfontosságú része a kvantitatív módszerek fejlesztésének.

A teljes proteom mennyiségi meghatározásához a DIA hatékony eszköz, mivel nagy áteresztőképességű és jól reprodukálható, azonban a fehérjék abszolút mennyiségi meghatározásának legfőbb eszközei a célzott (SRM és PRM) módszerek. Ezekhez viszont előre meg kell határozni a célmolekulákat. Kiválasztásukban jelentős szerepet játszhatnak a DIA előkísérletekből származó információk. A kvantitatív jelkiválasztás két szintű a bottom-up proteomikában: olyan peptideket kell kiválasztani, amelyek specifikusan képesek tükrözni a

mintában lévő célfehérjék mennyiségét. A kvantitatív meghatározáshoz ezek legérzékenyebb és legrobosztusabb prekursor- és fragmentumait kell használni.

2. Célok

Dolgozatomban két különböző projektet mutatok be, mindkettő a DIA adatgyűjtésen alapul. Az első projektben a fő célunk egy új könnymintavételi protokoll alkalmazhatóságának igazolása volt fenolvörössel kezelt pamutszál (PRT) használatával. A projekt céljai a következők voltak: 1) megvizsgálni az alkalmazott spektrumkönyvtár hatását a DIA mérések eredményeire, 2) összehasonlítani különböző fehérje extrakciós protokollokat a hatékony mintaelőkészítés elérése érdekében, 3) összevetni az új eljárást a két leggyakrabban használt módszerrel a minták reprodukálhatósága és a mérhető proteom alapján.

A második projektben fő célunk egy célzott LC-MS (PRM) módszer fejlesztése volt különböző membrántranszporter fehérjék célzott mérésére, főként a DIA adatgyűjtést alkalmazó kísérletes vizsgálatokra alapozva. A következő célokat tűztük ki: 4) összehasonlítani két, az LC-MS proteomikai vizsgálatokban gyakran használt membrándúsítási és emésztési protokollt, 5) kidolgozni egy módszert egy adott fehérje olyan peptidjeinek kiválasztására, amellyel a legérzékenyebb célzott módszer hozható létre, 6) meghatározni a különböző membrántranszport vizsgálatokban használt vezikulákban és sejtvonalakban a túltermelt transzporter fehérjék abszolút mennyiségét.

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Minták

3.1.1. Könny minták

A könnymintákat 10 önkéntes jobb és bal szeméből gyűjtöttük három különböző mintavételi technikával: üvegapillárisok (CAP), PRT-k és Schirmer-csíkok segítségével. A minta előkészítése során a Schirmer-csíkokat a szemgolyóval közvetlenül érintkező alsó (SL), és nem érintkező felső (SU) részekre osztottuk. Az SU minták a csíkok behajtását követő 10 mm-es szakaszok voltak.

3.1.2. Sejt és membrán minták

A vizsgálatokhoz HEK293 teljes sejtek (TC) lizátumait, szerves Organic Anion Transporting Polypeptide 1B3 (OATP1B3) túltermelő HEK293 sejtek membránfehérje frakcióit (PE, ProteoExtract® Native Membrane Protein Extraction kit segítségével dúsítva), Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) túltermelő humán vezikula készítményeket (BCRP-HEK293, BCRP-M), valamint humán BCRP-t túltermelő rovar vezikula készítményeket (BCRP-Sf9, BCRP-Sf9-HAM) használtunk.

3.2. A könnyfehérjék extrakciója és a PRT fehérje extrakciós módszerek vizsgálata

Három egészséges személytől gyűjtöttünk könnymintát üvegkapillárisok segítségével, majd összekevertük őket. Kilenc darab 5 cm hosszú PRT szálát helyeztünk az összekevert könnymintába 15 másodpercre. Ezt követően a szálakat három csoportra osztottuk. A PRT-kből történő fehérje extrakció hatékonyságának vizsgálatához 5%-os nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) ammónium-bikarbonátban (AmBic), AmBic-ot és vízzel kevert 1%-os ecetsavat teszteltünk. Az összes SL, SU és kísérleti PRT mintát egyenként extraháltuk 5% SDS-t tartalmazó AmBic segítségével. A CAP könnymintákat ugyanezzel az extrakciós oldattal hígítottuk a fehérjekoncentráció meghatározása előtt.

3.3. Emésztési protokollok

Az emésztés előtt minden minta fehérjetartalmát BCA fehérjemérő kit segítségével határoztuk meg. Minden könnymintánál és a megfelelő sejt- és membránmintáknál 10 µg fehérjét dolgoztunk fel módosított fehérjepellet emésztés (SEPOD) alapján. A többi sejt- és membránmintából 10 µg (25 µg a célzott BCRP mérésekhez) fehérjét módosított szűrővel segített mintaelőkészítési módszer (FASP) alapján dolgoztunk fel.

3.4. NanoLC-MS mérések

Minden mérést egy Waters ACQUITY UPLC M-Class LC-rendszerrel végeztünk, amelyhez egy Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ tömegspektrométert kapcsolunk. A peptidok kromatográfiás elválasztása gradiens elúcióval történt, mozgófázisként vizet és acetonitrilt használtunk, mindkettő 0,1% hangyasavat tartalmazott.

3.5. DIA adatgyűjtés és feldolgozás

A mintaspecifikus spektrumkönyvtárak létrehozásához szükséges adatokat a mintaspecifikus keverék minták LC-MS elemzésével gyűjtöttük. A tömegspektrométert úgy konfiguráltuk, hogy hat gázfázisú fracionált (GPF-DIA) adatgyűjtést végezzen 4 Th prekursor izolációs ablakszélességgel, átfedő mintát alkalmazva. A kísérleti mintaspecifikus könyvtárakat úgy hoztuk létre, hogy az egyes mintacsoportok GPF méréseivel külön-külön keresést végeztünk a prediktált spektrumkönyvtárral. A kísérleti kombinált spektrumkönyvtárat úgy hoztuk létre, hogy az összes projektspecifikus GPF mérés keresését egyben végeztük el ugyanazon prediktált spektrumkönyvtárral. Az egyes minták kvantitatív elemzéséhez 395 és 1020 Th között, 27×22 Th átfedő prekursor izolációs ablakokat alkalmazó LC-MS méréseket használtunk DIA adatgyűjtéssel (DIA-Q).

3.6. PRM adatgyűjtés és feldolgozás

A tömegspektrométert úgy konfiguráltuk, hogy az adatokat a 2 Th szélességű izolációs ablakkal kiválasztott +2 töltésű peptid prekursorok fragmenseinek spektrumáról gyűjtse.

A különböző peptideket alkalmazó módszerek érzékenységének összehasonlításához kalibrációs görbék alapján számolt relatív kimutatási határ (LOD) és relatív mennyiségi határ (LOQ) értékeket használtunk. A kalibrációs görbéket a túltermelő HEK293 emésztmények kontroll HEK293 emésztménnyel történő hígításával hoztuk létre 5 különböző arányban (5-szörös és 100-szoros hígítás között).

A mennyiségi összehasonlításokhoz Welch T-próbákat végeztünk, p -érték $<0,05$ szignifikanciahatárral.

4. Projekt I: Könny minták proteom analízise DIA segítségével

4.1. Elméleti háttér

A humán könnyfolyadék az utóbbi évtizedekben egyre nagyobb érdeklődést keltett különböző biomarkerek potenciális forrásaként. Előnyei a könnyű hozzáférhetőség, a nem invazív mintavételezési lehetőség, mérsékelt komplexitás és a szemészeti és szisztémás betegségekre való érzékenység.

Mind a klinikai, mind a kutatási célra szánt könny mintavételezés legelterjedtebben használt módszerei, amikor a könnyfolyadékot közvetlenül egy üvegapillárba gyűjtik, vagy a könny minta abszorbeálására alkalmas Schirmer-csíkra futtatják. Mindkét mintavételi módszernek egyaránt vannak előnyei és hátrányai is. Gyakran időigényesek, kényelmetlenek a betegek számára, szakember közreműködését igénylik, és néha nem biztosítanak elegendő mennyiségű mintát az vizsgálatokhoz. Egy egyszerű, gyors, nem invazív és megbízható könnygyűjtési eljárásra van szükség, amely még kis mennyiségű mintából is torzítatlan könnymintát biztosít. A PRT-vel történő könny mintavétel megfelelhet a fenti követelményeknek.

4.2. Eredmények

Minőségi és mennyiségi proteomikai vizsgálatokat végeztünk az összes önkéntes bal és jobb szeméből származó mintájával egyaránt: összesen 20 PRT, 20 SU, 19 SL és 18 CAP könnymintát elemeztünk. A CAP mintavételi eljárással gyűjtött könnyek mennyisége és teljes fehérjetartalma egyaránt nagy szórást mutatott. Az SL-csíkok, a 10 mm hosszú SU-csíkok és a teljes PRT minták extraktumainak teljes fehérjetartalma jobban reprodukálható volt. Ezekkel a

mintavételi módszerekkel minden esetben elegendő mintát lehetett gyűjteni a proteomikai analízishez, míg ez a CAP módszerrel két esetben nem sikerült.

Három különböző extrakciós oldatot (5%-os SDS AmBic-ban, AmBic és 1%-os ecetsav vízben) teszteltünk a PRT mintákból történő fehérje extrakció hatékonyságának és reprodukálhatóságának vizsgálatára. Az extrahált fehérjék teljes mennyiségében nem tapasztaltunk jelentős különbségeket; a legalacsonyabb reprodukálhatóságot azonban az ecetsav használatával találtuk. A detektált és kvantitált fehérjék száma, a fehérjeintenzitások reprodukálhatósága (CV) és az eredeti kapilláris mintával való korreláció hasonló volt az SDS és az AmBic protokollok használatával, de az ecetsav protokoll teljesített a legrosszabbul az összes említett mérőszám tekintetében. Mivel a tenzid jelenléte segítheti a fehérje extrakciót és a Schirmer-csíkok esetében alkalmazott protokollal való jobb összehasonlíthatóság érdekében az SDS-sel történő extrakciót használtuk a további vizsgálatokhoz.

A DIA-Q minták elemzése során a gyűjtött adatokat a mintaszpecifikus és a kombinált spektrumkönyvtárral is lekerestük. A kvantitált peptidok száma 117,5%-kal, 84,7%-kal és 62%-kal volt magasabb az SU, CAP és PRT minták esetében, amikor a keresést a mintaszpecifikus könyvtárak helyett a kombinált könyvtárral végeztük, de az SL minták esetében ennek kisebb hatása volt. Azon peptidok, melyek csak a kombinált spektrumkönyvtárral voltak detektálhatók, a DIA-Q minták jelentős részében kvantitálhatók voltak. Nagyon hasonló eredményt kaptunk a fehérjék szintjén is.

A CAP, SL, SU és PRT minták proteomjának összehasonlításához a mintaszpecifikus keverék minták GPF-DIA elemzéséből létrehozott kombinált spektrumkönyvtárat használtuk, mivel ez rendelkezik a legnagyobb fehérjelefedettséggel. A könyvtárban szereplők közül legkevesebb fehérjét a CAP mintában lehetett azonosítani (422 fehérje). A két indirekt könnymintában (PRT és SU) hasonló számú fehérjét lehetett kimutatni (1439 és 1225), nagy átfedés mellett, míg az SL mintában 2493 fehérjét azonosítottunk. Összesen 341 közös fehérjét lehetett kimutatni mind a négy mintatípusban. A különböző mintatípusok mennyiségi hasonlóságának vizsgálatára Pearson-féle korrelációs együttható értékeket számoltunk, amelyek a PRT és SU minták között voltak a legerősebbek ($r = 0,90$), de a CAP minta is nagyfokú korrelációt mutatott ezekkel a mintákkal ($r = 0,76-0,78$).

A DIA-Q mintákon végeztük a fehérjék statisztikai osztályozását a mintaszpecifikus detektálhatóságuk alapján. Az 1144 kvantitálható fehérjét a mintatípus-specifikus detektálási gyakoriság (%-ban) alapján négy klaszterbe soroltuk (A-tól D klaszterig jelölve) K-means klaszterelemzés eredményeként. Az A klaszterben 195 olyan fehérje volt, amely minden mintatípusban nagy gyakorisággal volt mérhető. A B klaszterbe 242 olyan fehérje tartozott,

amelyek az indirekt protokollokkal (SL, SU és PRT) gyűjtött mintákban ismételt mérhetőek voltak, de csak néhány CAP mintában voltak kvantitálhatók. A másik két klaszter olyan fehérjékből állt, amelyek az SL mintákban nagy gyakorisággal, de az SU és PRT mintákban csak közepes (C klaszter, 312 fehérje) vagy alacsony (D klaszter, 395 fehérje) gyakorisággal voltak jelen. Ezek alapján az A és B klaszter fehérjei tekinthetők a fő könnyfehérjéknek melyek nagy gyakorisággal kimutathatók az egyes könnymintákban. A lehetséges szennyező fehérjék, amelyek a szem felszínről származhatnak (C és D klaszter) az SL mintákban voltak a legnagyobb gyakorisággal megtalálhatók. A B klaszter fehérjei csak néhány CAP mintában voltak detektálhatók, míg ezen fehérjék relatív gyakorisága is az SL mintákban volt a legnagyobb. Az A klaszter tagjai adták a CAP minták fehérjeintenzitásának legnagyobb részét (95%) és valamivel kevesebb, mint 50%-át az SL mintákénak. Ezen fehérjék átlagos összabundanciája magasabb volt a PRT (83%), mint az SU (76%) mintákban.

A könnyminták fehérjeinek biológiai osztályozása érdekében minden egyes fehérjét a rendelkezésre álló Gene Ontology (GO) és UniProt kifejezésekkel annotáltunk. A specifikus intracelluláris lokalizációjú GO kifejezéssel rendelkező fehérjék a D klaszterben dúsultak, amelyek főként az SL mintákra voltak jellemzőek. A D klaszter fehérjeinek 21%-a a mitokondriumból származott, szemben az A klaszterrel, amelyben ezek a fehérjék csak 1%-át adják az összesnek. Az citoplazma lokalizációval jelölt fehérjék a B, C és D klaszterek mindegyikében feldúsultak (40-71%), míg az A klaszterben, amely az egyetlen olyan klaszter volt, amelyből ténylegesen lehetett kapillárisok segítségével mintát venni, csak 19%-ban voltak ilyen fehérjék. Az A klaszter fehérjeinek 63%-a szekretált, míg a D klaszter fehérjeinek mindössze 9%-a volt annotálva ezzel az Uniprot kulcsszóval. Ezekben az általános annotációkon kívül néhány szemspecifikusabb információt is használtunk, hogy tisztázzuk a különböző klaszterekbe tartozó fehérjék eredetét. Az EyeOME adatbázis az emberi szem különböző részeiben azonosított fehérjék listáját gyűjti össze. Ezekben a hozzárendelésekben nagy az átfedés, 1213 fehérje közösen hozzárendelt a könnyhöz és a szemfelszínhez (szaruhártya, ínhártya) is. Az A klaszter tagjainak többsége közös (124), vagy specifikus a könnyre (31), ezért javasoltuk, hogy ezeket a közös könnyfolyadék fehérjék közé soroljuk. Meg kell jegyeznünk, hogy az összes immunglobulin is annak tekinthető, mivel ezek az A klaszterben találhatóak, de az EyeOME-ből ki vannak zárva. A B klaszter fehérjeinek többsége (228 a 239-ből) az EyeOME-ban a könny és a szemfelszín közös fehérjei, ritkán mutathatók ki CAP mintákban, viszont az indirekt mintavételi módszerekkel könnyen és reprodukálhatóan gyűjthetőek, ezért ezek valószínűleg a könnyfolyadék alsó, a szemfelszínrel közvetlen kölcsönhatásban lévő rétegéből származhatnak. Összességében az A és B klaszterbe sorolt 437

fehérje (392 az EyeOME-ban) az eredetüktől függetlenül gyakran kimuatható könnyfehérjéknek minősíthető.

A mintavétel által a mintösszetételben okozott hatások azonosítása érdekében ugyanazon személy könnymintáinak fehérjeösszetételét az intenzitások Pearson-féle korrelációjának segítségével hasonlítottuk össze. Az erősen szennyezett SL mintákat kizártuk ebből a vizsgálatból. A legerősebb személyen belüli korrelációt a CAP mintákban találtuk, míg a PRT minták és az SU minták gyengébb korrelációt mutattak.

A két szemén mért fehérjeintenzitás arányok eloszlása a CAP minták esetében volt a legszűkebb, a Schirmer-minták esetében pedig a legszélesebb. Az összes mintatípusban közös 195 fehérje (A klaszter) medián CV értéke a PRT mintákban alacsonyabb volt (64%), mint az SU (77%) vagy a CAP (70%) mintákban.

4.3. Diskusszió

Számos könny mintavételi módszer áll rendelkezésre, de mivel mindegyik mintavételi módszernek vannak előnyei és hátrányai is, a megfelelő módszer kiválasztása nem könnyű. A leggyakrabban használt klinikai és kutatási célú könnymintavételek, amikor a könnyfolyadékot közvetlenül egy üvegkapillárisba gyűjtik, vagy a könny minta abszorbeálására alkalmas Schirmer-csíkra futtatják. A PRT, az előző két teszthez hasonlóan, széles körben elterjedt klinikai teszt a könny mennyiség mérésére, de proteomikai könnymintavételi technikaként még nem vizsgálták.

Megerősítettük, hogy a fehérjék hatékonyan extrahálhatók a PRT-kből az 5%-os SDS és AmBic protokollok használatával is. Az eredeti könny fehérjék 84-86%-át lehetett torzítás nélkül, kiváló reprodukálhatósággal kinyerni ezekkel a módszerekkel.

Összehasonlítottuk a PRT és a két hagyományos módszerrel gyűjtött minták fehérjeösszetételét. A szakirodalom szerint a kapilláris minták nagyobb arányban tartalmaznak extracelluláris régióból származó fehérjéket, míg a Schirmer mintákban nagyobb számú sejt- és organellespecifikus (intracelluláris) fehérje található, ami a papír erősen vaszkularizált kötőhártyával való érintkezésének köszönhető.

Eredményeink összhangban vannak az irodalommal, mivel a Schirmer-csíkkal gyűjtött mintákban több fehérjét azonosítottunk, mint a kapilláris mintákban. Az azonosított fehérjék száma a PRT mintákban hasonlóan magas volt, mint az SU mintákban és a fehérjék intenzitása erős korrelációt mutatott a többi mintatípussal. Ez bizonyítja a PRT módszer alkalmazhatóságát az LC-MS analízishez szükséges proteomikai minták hatékony gyűjtésére.

Kísérleteinkben a nagyszámú fehérje azonosítását GPF-DIA LC-MS módszer alkalmazása tette lehetővé. A különböző mintatípusok kombinált spektrumkönyvtárának alkalmazása a kísérleti minták jelentős részében növelte a könnyfolyadékban kvantitálható fehérjék számát. Ez alapján hatékony módszer lehet többféle mintatípus felhasználása a könyvtár létrehozásához, függetlenül a kvantitatív kísérlethez alkalmazott mintavételi protokolltól. Az mintatípusokban mért detektálási gyakoriság alapján négy fehérje-klasztert tudunk azonosítani és ezen klaszterek EyeOME adatbázissal való összehasonlításával 437 fehérjét (A + B klaszter) azonosítottunk, amelyek gyakori könnyfolyadék fehérjének tekinthetők, de ezek közül (az immunglobulinokon felül) csak 155-öt tudunk hatékonyan kimutatni a kapilláris mintákban. A PRT valamivel nagyobb hatékonysággal képes mindezen fehérjék mintavételére, mint a Schirmer-csík. A szemfelszínről származó lehetséges szennyező fehérjék (D klaszter) összesített relatív intenzitása a PRT mintákban a legalacsonyabb (kevesebb mint 1%). Ez a PRT kisebb átmérőjének és a Schirmer-csíkokhoz képest kisebb és simább felületének következménye lehet.

A PRT biomarker-analízisben való alkalmazásának validálása érdekében könnybiomarkereket gyűjtöttünk össze a szakirodalmi adatok alapján. 87 olyan fehérjét találtunk, amelyeket korábban feltételezett biomarkerként azonosítottak könnyben, ezek 90%-a (78 fehérje) azon fehérjék közé tartozik, amelyeket az indirekt mintavételi módszerekkel gyakran detektáltak. Ezeket az eredményeket figyelembe véve PRT megfelelő mintavételi módszer lehet mind a szemspecifikus, mind a szisztémás betegségek biomarkereinek vizsgálatára. A PRT módszerrel erősebb korrelációt és kisebb különbségeket találtunk ugyanazon személy két szeméből származó mintái között, mint a Schirmer-rel (SU minták). A személyek közötti variancia a PRT mintákban volt a legalacsonyabb, lényegesen kisebb, mint az SU mintákban, így összehasonlító elemzésekre alkalmasabb lehet.

5. Project II: DIA adatgyűjtés, mint a célzott mérések előkísérlete, valamint a létrehozott célzott mérések alkalmazása

5.1. Elméleti háttér

A transzmembrán transzporterek jelentős hatással vannak számos gyógyszer farmakokinetikájára és farmakodinamikájára. Az ATP-kötő kazettás transzporter (ABC) és szerves anion transzporter (SLC) fehérjék felelősek leginkább a gyógyszer molekulák sejtmembránon keresztüli átjuttatásáért. Ezen transzporterek mennyiségi meghatározása jelentősen növeli az *in vitro* gyógyszer metabolizmus mérések eredményének használhatóságát, mivel a mért transzporter aktivitást jelentősen befolyásolja az adott transzporterek mennyisége.

Az LC-MS/MS alapú célzott kvantitatív proteomika megfelelő technika akár több fehérje egyetlen mérésben történő mennyiségi meghatározására.

Az alkalmazott peptideknek néhány *in silico* kritérium mellett, gyakorlati feltételeknek is meg kell felelniük. Így például a célzott LC-MS mérésekben alkalmazott peptid ionizációs hajlamának alkalmasnak kell lennie az érzékeny detektálásához. A peptideknek kellően nagy mennyiségben kell keletkezniük enzimatis emésztés során a reprodukálható kimutatáshoz, valamint a szekvenciájuknak specifikusnak kell lennie a célfehérjére. Az *in silico* és a kísérleti (LC-MS DIA) technikákon alapuló kombinált megközelítés lehet a legmegfelelőbb a peptidek megbízható módon történő kiválasztásához.

Mivel a vizsgált transzporterek a plazmamembránban találhatóak és ott is működnek, ezen kívül gyakran nagyon alacsony szinten fejeződnek ki, a megfelelő kimutatásukhoz a legérzékenyebben mérhető peptidek használata mellett valamilyen membrándúsítási módszerre is szükség lehet. A jelenleg rendelkezésre álló membrántisztítási technikákkal azonban a plazmamembránt nehéz elkülöníteni a többi membrántól. A membránfehérjék kimutatásának további nehézsége, hogy gyakran nagy méretük és hidrofób tulajdonságúak. Megfelelő kezelésükhöz és oldatban tartásukhoz elkerülhetetlen a viszonylag nagy mennyiségű detergens használata, ami megnehezítheti a minták további feldolgozását és elemzését.

5.2. Eredmények

A cél az volt, hogy összehasonlítsuk a sejtekből a PE kit segítségével izolálható membrán fehérjeösszetételét a vezikuláris transzportvizsgálatokhoz használt membránpreparátummal. Mindkét típusú membrándúsított mintát összehasonlítottuk a TC lizátumokkal SEPOD emésztést követően, a fehérjék és peptidek számát, valamint mennyiségét tekintve. A dúsított mintákban több és intenzívebb jellel mérhető membránfehérjét és peptidet mértünk, mint a TC lizátumokban. A membránfehérjék és membránpeptidek relatív intenzitása nem különbözött a két membránminta között. Az ABC + SLC fehérjék száma körülbelül 1,5-1,6-szor nagyobb volt a dúsított (PE és vesicula) mintákban, mint a TC mintákban. Ezen membránfehérjék teljes intenzitásának aránya körülbelül 2,6-3,8-szorosára nőtt a TC mintákban mért értékekhez képest. Az izolációs technikákkal kapott mintaösszetétel jellemzésére és a TC lizátumokkal való összehasonlításra a DIA mérésekből szelektíven kiértékelünk különböző sejtalkotókra specifikus markerfehérjéket. Mind a PE, mind a vezikuláris minták citoszolikus fehérjetartalma jelentősen kisebb volt, mint a TC mintáké, ezzel együtt a plazmamembrán fehérjetartalma mindkét dúsítási protokollt alkalmazva jelentősen megnőtt. Mindkét membránizolálás eredményeként a sejtmagfehérjék kisebb mennyiségben, a mitokondriális membránfehérjék

nagyobb mennyiségben voltak jelen, míg a Golgi membránfehérjék csak a vezikulamintákban dúsultak fel szignifikánsan a TC-hez képest.

A membránfehérjék nagy mérete és extrém hidrofób jellege miatt nem kerülhető el a jelentős mennyiségű detergens használata. Olyan mintaelőkészítési/emésztési protokollra van szükség, mint például a FASP és a SEPOD, amely képes eltávolítani ezeket az anyagokat a mintaelőkészítések során. A minta peptidösszetétele azonban nagymértékben függ az alkalmazott emésztési módszertől, ezért fontos annak hatását vizsgálni. A SEPOD protokollal több fehérje és peptid volt kvantitálható, mint a FASP-pal, mind a PE, mind a vezikulaminták esetében, azonban a különbség a PE minták esetében nagyobb volt. Mindkét módszerrel a membránfehérjék és peptidek számának átlagos aránya az összeshez képest körülbelül 40% volt, míg ez a szám az ABC + SLC transzporterek esetében 2% körül volt. Az emésztési protokollok közötti különbségek a peptidek szintjén nagyobbak voltak, mint a fehérjék szintjén. A mért intenzitások reprodukálhatósága jobb volt a SEPOD használatával mind a membrán, mind az ABC + SLC fehérjék és peptidek esetében.

A célzott kvantitatív meghatározáshoz legmegfelelőbb peptidek kiválasztása szekvencia alapú *in silico* elemzésen és kvantitatív kísérleti vizsgálatokon alapult. Vizsgáltuk a valószínűleg problémás aminosavak, az ismert poszttranszlációs módosítások és a lehetséges kihagyott enzimatis hasítási helyek jelenlétét az adott peptidszekvencián belül és annak közvetlen környezetében. Figyelembe vettük a peptidek fehérjén belüli elhelyezkedését is.

A legérzékenyebb módszer megállapításához fontos ismerni a különböző peptidek alkalmazásával elérhető kimutatási (LOD) és mennyiségi határértékeket (LOQ). Mivel ezek az értékek nagymértékben függenek a minta mátrixától, kidolgoztunk egy módszert, a peptidek azonos mátrixban történő relatív LOD és LOQ értékének meghatározására. Ehhez egy hígítási sorozatot készítettünk úgy, hogy egy túltermelő minta emésztményét több ismétlésben összekevertük ugyanannak a sejtvonalnak kontroll emésztményével. A relatív LOD és LOQ értékeket a kapott kalibrációs görbék lineáris regressziós adataiból számoltuk ki. Minden szempontot figyelembe véve az NQTANLTNQGK peptid bizonyult a legjobbnak OATP1B3 fehérje abszolút mennyiségi meghatározására. A peptideket a BCRP fehérje mennyiségi meghatározásához is kiválasztottuk a fent bemutatott módszerrel. Mivel a cél az volt, hogy a humán BCRP mellett más fajok által kifejezett BCRP-t is kvantitáljunk, az SLLDVLAAR peptid mellett egy másik peptidet (LLSDLLPMR) is használtunk, mivel az egy evolúciósan konzervált régióból származik. Az LLSDLLPMR peptid metionin-szulfoxidját DIA mérésekből követtük nyomon. A relatív metionin oxidáció $5,65 \pm 0,49\%$ volt a teljes kísérlet során, azonos válaszfaktorokat feltételezve az oxidált és nem oxidált formákra.

A HEK293-OATP1B3-LV sejtekben az OATP1B3 expressziós stabilitását vizsgáltuk szövetlombiktenyésztés és többszöri passzálás során a kiválasztott NQTANLTNQGK peptid használatával. Ehhez a sejtekből PE kit segítségével membránfrakciókat készítettünk három biológiai replikátumból (A, B és C) a tenyésztés kezdetén (0 passzálás), valamint 8 és 16 passzálás (kb. 1 és 2 hónap) után. Mivel a konkrét abszolút mennyiségek nem publikusak, az egyik minta kezdeti mennyiségét 100%-nak vettük. A többi mintában mért mennyiséget ehhez a mennyiséghez viszonyítottuk. A vizsgált transzporter expressziójában nem volt szignifikáns különbség az ismétlések és az időpontok között. Az OATP1B3 expressziójának relatív standard eltérése (RSD) a minták között alacsony, 7,7% és 11,7% volt a kísérlet kezdeti időpontjában és 8 passzálás után, de 16 passzálás után magasabb értéket (21,9%) figyeltünk meg. A kidolgozott célzott módszer LOQ értéke 0,014 pmol / mg membránfehérje volt, a nehézizotóp jelzett NQTANLTNQGK standard intenzitásának RSD-je pedig 8,5% volt a mérések során.

A BCRP transzporter fehérje abszolút mennyiségét négy különböző vezikula típusban (HEK293, MCF-7/MX, Sf9 és SF9-HAM) határoztuk meg, amelyek mindegyike ugyanazt a humán BCRP fehérjét termelte túl. A mennyiségi meghatározáshoz két fehérjespecifikus peptid (SSLLDVLAAR és LLSDLLPMR) átlagát használtuk, mivel a két peptid mennyisége hasonló volt ezekben a mintákban. A különböző típusú vezikula minták BCRP expressziójában nem mutattunk ki szignifikáns különbséget. A célzott módszerrel 0,030 pmol / mg membránfehérje LOQ-érték érhető el (SSLLDVLAAR használatával), a nehézizotópokkal jelzett SSLLDVLAAR és LLSDLLPMR peptid intenzitásának RSD-je pedig 8,0 %, illetve 10,8 % volt.

5.3. Diskusszió

A transzporterek mennyiségi meghatározásához szükséges mintaelőkészítés egyik kulcsfontosságú része a tiszta sejtmembránfrakció izolálása. Ezért a PE membránizolátumokat összehasonlítottuk a vezikula preparátumokkal, hogy megvizsgáljuk a kapott proteomban lévő különbségeket, különösen az ABC és SLC transzporterek mennyisége tekintetében. A minták membránfehérje tartalmát mindkét membrándúsítási protokollal hatékonyan növeltük, ezzel együtt a mérhető ABC és SLC transzporterek száma, valamint relatív intenzitása is jelentősen megnőtt. Mindkét módszer képes volt csökkenteni a citoszolikus fehérjék arányát a mintákban a teljes sejtmintákhoz képest. Bár a különböző szubcelluláris membránok (ER, Golgi, mitokondrium) feldúsulásában a két protokollban voltak különbségek, a membránfehérjék intenzitásai erős korrelációt mutattak.

A bottom-up proteomikában az eredmények másik fontos befolyásoló tényezője az alkalmazott emésztési protokoll. A FASP és a SEPOD között a detektált fehérjék és peptidek számában a különbség kisebb volt a vezikula minták esetében, mint a PE minták esetében, valószínűleg azért, mert a vezikula minták nem tartalmaztak detergenset. Bár a FASP protokollban egy extra detergens eltávolítási lépést alkalmaztunk, a nagy mennyiségű detergenst tartalmazó PE minták esetében a SEPOD használata előnyösebb volt, mivel nagyobb mennyiségű fehérje és peptid volt kvantitálható, mint a FASP protokollal. Nem volt különbség a relatív intenzitások ismételtetésében a PE és a vezikula minták között azonos emésztési protokollt használva, ugyanakkor a SEPOD használatával a CV-k alacsonyabbak voltak mindkét mintatípus esetében.

A fehérjék mennyiségi meghatározásához megfelelő peptid kiválasztásának jelentős hatása van a végeredményre. Az ugyanabból a fehérjéből származó peptid ionizációs képessége több mint három nagyságrenddel térhet el egymástól. A legrobustusabb, legmegbízhatóbb és legérzékenyebb célzott módszer létrehozásához a legmegfelelőbb peptidet kell kiválasztani több kritérium alapján. Az OATP1B3 és a BCRP fehérjék abszolút mennyiségi meghatározásához alkalmazott peptidokat egy kombinált kritériumrendszer alapján választottuk ki. A legintenzívebb peptidok relatív LOQ értékeit kalibrációs görbék segítségével határoztuk meg. Ha az overexpresszált minták emésztményeit ugyanabból a sejttypusból származó kontroll emésztménnyel hígítottuk, a mátrixhatás a relatív LOQ meghatározás során állandó volt. Ezzel a módszerrel pontos információt kaphattunk arról, hogy a vizsgált peptidokkal az adott mátrixban a túltermelt mennyiség mekkora hígítása detektálható. A szekvenciára és fehérjén belüli pozícióra vonatkozó korlátozások, az online elérhető információk és a kísérleti DIA adatok (MS2 intenzitás, relatív LOQ érték) kombinációját figyelembe véve választottuk ki a PRM mérésekhez a legalkalmasabb peptidokat.

A létrehozott célzott módszerek alkalmazásával igazolni tudtuk, hogy az OATP1B3 fehérje expressziója 16 passzálon, azaz mintegy 2 hónapon keresztül stabil volt HEK293-OATP1B3-LV sejtekben. A különböző sejtvonalakból készített, BCRP-t túltermelő vezikulákban nem volt szignifikáns különbség az expresszált BCRP mennyiségében, így ezek a membránok felhasználhatók aktivitásvizsgálatok elvégzésére.

6. Az új eredmények összefoglalása

- 1) A többféle mintavételi eljárásból gyűjtött könnyminták kombinált spektrumkönyvtárának alkalmazása mintaszpecifikus spektrumkönyvtárak helyett hatásos eljárásnak bizonyult a kvantitatívan meghatározható fehérjék számának növelésére a DIA LC-MS elemzésekben.

- 2) Megerősítettük, hogy az új PRT módszer rendkívül hatékony a könnyfolyadék fehérjéinek gyűjtésére. Az ezzel a módszerrel gyűjtött fehérjék hatékonyan és reprodukálhatóan extrahálhatók a fonalakból. A mikrokapillárisokkal ellentétben ez a módszer akkor is használható proteomikai vizsgálatokhoz, ha csak limitált mennyiségű könnyfolyadék áll rendelkezésre.
- 3) Az ezzel a módszerrel gyűjtött minták fehérjeösszetétele erősen korrelál az egyéb elterjedt módszerekkel gyűjtött mintákéval. A PRT módszerrel az egy személyen belüli és személyek közötti szórás kisebb volt, mint a többi mintavételi eljárással, mivel a PRT módszer gyors, nem irritáló és kis mintamennyiségek gyűjtésére is használható, valamint az így gyűjtött könny minta csak kismértékben szennyezett szemfelszíni fehérjékkel.
- 4) Klaszteranalízist alkalmaztunk a fehérjék osztályozására aszerint, hogy milyen gyakorisággal fordulnak elő a különböző könnymintákban. Ez alapján elkülönítettük a könnymintákban kimutatható gyakori könnyfolyadék fehérjéket, valamint a szemfelszíni fehérjéket.
- 5) A PE kit segítségével sejtekből készített membránizolátumok proteomját összehasonlítottuk a vezikuláris transzportvizsgálatokhoz használt membránpreparátumokkal. A markerfehérjék alapján voltak különbségek a membránok között, azonban a membránfehérjék és peptidek relatív mennyiségei erős korrelációt mutattak.
- 6) A SEPOD emésztési protokoll hatékonyabbnak bizonyult a tenzidtartalmú minták emésztésében, még azok eltávolítására irányuló külön lépések nélkül is. Ezzel a módszerrel több membránfehérjét, ABC és SLC transzportert tudunk kvantitálni jobb reprodukálhatósággal a membrándúsított mintákból, mint FASP-pal.
- 7) Létrehoztunk egy módszert a relatív LOQ meghatározására, amely segíthet az abszolút mennyiségi meghatározáshoz megfelelő peptidek kiválasztásában. Ehhez a fehérje túltermelő sejtekből származó emésztményeket hígítottuk az azonos sejtípusból származó kontroll emésztményekkel.
- 8) Célzott módszereink alkalmasak voltak a célfehérjék abszolút mennyiségének meghatározására, a kielégítő reprodukálhatóságnak köszönhetően a biológiai variabilitás mérésére a vezikula mintákban és a membrán-transzport vizsgálatokban használt sejtvonalakban is. Az OATP1B3-HEK293-LV sejtekben igazoltuk az expresszált OATP1B3 stabilitását 16 passzázs során, és a célzott BCRP kvantitatív meghatározás hozzájárult a különböző, BCRP-t túltermelő vezikula minták aktivitásvizsgálatainak értelmezéséhez.

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények listája:

- I. **Kecskeméti, G.**; Tóth-Molnár, E.; Janáky, T.; Szabó, Z. An Extensive Study of Phenol Red Thread as a Novel Non-Invasive Tear Sampling Technique for Proteomics Studies: Comparison with Two Commonly Used Methods. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8647, doi:10.3390/ijms23158647. **IF: 6.208 (2021)**
- II. Sáfár, Z.; **Kecskeméti, G.**; Molnár, J.; Kurunczi, A.; Szabó, Z.; Janáky, T.; Kis, E.; Krajcsi, P. Inhibition of ABCG2/BCRP-Mediated Transport—Correlation Analysis of Various Expression Systems and Probe Substrates. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2021**, *156*, 105593, doi:10.1016/j.ejps.2020.105593. **IF: 5.112**

Az értekezéstől független közlemények listája:

1. Jójárt, R.; Pécsy, S.; Keglevich, G.; Szécsi, M.; Rigó, R.; Ozvegy-Laczka, C.; **Kecskeméti, G.**; Mernyák, E. Pd-Catalyzed Microwave-Assisted Synthesis of Phosphonated 13 α -Estrones as Potential OATP2B1, 17 β -HSD1 and/or STS Inhibitors. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 2838–2845, doi:10.3762/bjoc.14.262. **IF: 2.592**
2. Bacsa, I.; Konc, C.; Orosz, A.B.; **Kecskeméti, G.**; Rigó, R.; Zvegy-Laczka, C.; Mernyák, E. Synthesis of Novel C-2- or C-15-Labeled BODIPY—Estrone Conjugates. *Molecules* **2018**, *23*, 821, doi:10.3390/molecules23040821. **IF: 3.060**
3. Tömösi, F.; **Kecskeméti, G.**; Cseh, E.K.; Szabó, E.; Rajda, C.; Kormány, R.; Szabó, Z.; Vécsei, L.; Janáky, T. A Validated UHPLC–MS Method for Tryptophan Metabolites: Application in the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *185*, 113246, doi:10.1016/j.jpba.2020.113246. **IF: 3.935**
4. Gieszinger, P.; Stefania Csaba, N.; Garcia-Fuentes, M.; Prasanna, M.; Gáspár, R.; Sztojkov-Ivanov, A.; Ducza, E.; Márki, Á.; Janáky, T.; **Kecskeméti, G.**; et al. Preparation and Characterization of Lamotrigine Containing Nanocapsules for Nasal Administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2020**, *153*, 177–186, doi:10.1016/j.ejpb.2020.06.003. **IF: 5.571**
5. Ambrus, R.; Gieszinger, P.; Gáspár, R.; Sztojkov-Ivanov, A.; Ducza, E.; Márki, Á.; Janáky, T.; Tömösi, F.; **Kecskeméti, G.**; Szabó-Révész, P.; et al. Investigation of the Absorption of Nanosized Lamotrigine Containing Nasal Powder via the Nasal Cavity. *Molecules* **2020**, *25*, 1065, doi:10.3390/molecules25051065. **IF: 4.412**
6. Bartos, C.; Ambrus, R.; Kovács, A.; Gáspár, R.; Sztojkov-Ivanov, A.; Márki, Á.; Janáky, T.; Tömösi, F.; **Kecskeméti, G.**; Szabó-Révész, P. Investigation of Absorption Routes of Meloxicam and Its Salt Form from Intranasal Delivery Systems. *Molecules* **2018**, *23*, 784, doi:10.3390/molecules23040784. **IF: 3.060**
7. Katona, G.; Balogh, G.T.; Dargó, G.; Gáspár, R.; Márki, Á.; Ducza, E.; Sztojkov-Ivanov, A.; Tömösi, F.; **Kecskeméti, G.**; Janáky, T.; et al. Development of Meloxicam-Human Serum Albumin Nanoparticles for Nose-to-Brain Delivery via Application of a Quality

by Design Approach. *Pharmaceutics* **2020**, 12, 97, doi:10.3390/pharmaceutics12020097. **IF: 6.321**

8. Tuka, B.; Nyári, A.; Cseh, E.K.; Körtési, T.; Veréb, D.; Tömösi, F.; **Kecskeméti, G.**; Janáky, T.; Tajti, J.; Vécsei, L. Clinical Relevance of Depressed Kynurenine Pathway in Episodic Migraine Patients: Potential Prognostic Markers in the Peripheral Plasma during the Interictal Period. *J. Headache Pain* **2021**, 22, doi:10.1186/s10194-021-01239-1. **IF: 8.592**
9. Jójárt, R.; Laczkó-Rigó, R.; Klement, M.; Kóhl, G.; **Kecskeméti, G.**; Özvegy-Laczka, C.; Mernyák, E. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Estrone Phosphonates as High Affinity Organic Anion-Transporting Polypeptide 2B1 (OATP2B1) Inhibitors. *Bioorg. Chem.* **2021**, 112, 104914, doi:10.1016/j.bioorg.2021.104914. **IF: 5.307**
10. Annus, Á.; Tömösi, F.; Rárosi, F.; Fehér, E.; Janáky, T.; **Kecskeméti, G.**; Toldi, J.; Klivényi, P.; Sztriha, L.; Vécsei, L. Kynurenic Acid and Kynurenine Aminotransferase Are Potential Biomarkers of Early Neurological Improvement after Thrombolytic Therapy: A Pilot Study. *Adv. Clin. Exp. Med.* **2021**, 30, 1225–1232, doi:10.17219/acem/141646. **IF: 1.736**

Közlemények száma: 12 (1 első szerzős)

Összesített impakt faktor: 55.905

Független idézetek száma (MTMT2): 53

<https://m2.mtmt.hu/gui2/?type=authors&mode=browse&sel=10063503&view=pubTable>

Hirsch index: 6

1.sz. melléklet

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott Sáfár Zsolt (felelős társszerző) kijelentem, hogy Kecskeméti Gábor (pályázó) PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott - közösen publikált - tudományos eredmények elérésében a pályázónak meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más a PhD fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

2022. 06. 08.
dátum


.....
szerző

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemények:

- [1] Z. Sáfár, G. Kecskeméti, J. Molnár, A. Kurunczi, Z. Szabó, T. Janáky, E. Kis, P. Krajcsi, Inhibition of ABCG2/BCRP-mediated transport–correlation analysis of various expression systems and probe substrates, Eur. J. Pharm. Sci. 156 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105593>.