

**A tömegspektrometria kvalitatív és kvantitatív
proteomikai alkalmazása**

Ph.D. értekezés tézisei

Szájli Emília

Témavezető: Dr. Medzihradszky-Fölkl Katalin

Kémia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ

Proteomikai Kutatócsoport

Szeged

2009

Bevezetés

Az SzBK Proteomikai Kutatócsoportjában peptidkeverékek vizsgálata folyik biológiailag releváns mintákból. A kutatási munkám, amelyen a Ph.D. értekezésem alapul, a következő részekre tagolható:

- I. Fehérjeazonosítás
 - II. Fehérjék kvantitatív analízise
 - III. Poszt-transzlációs módosítások vizsgálata
- I. **Fehérjeazonosítás:** A fehérjeminták tömegspektrometriás vizsgálata azok enzimatis, vagy kémiai úton történő emésztése során keletkező peptidok molekulasúly- és szekvencia-meghatározásán alapul. A MALDI-TOF MS széles körben alkalmazott analitikai eljárás kiváló érzékenysége, viszonylag rövid analízis ideje, egyszerű kezelhetősége és nem utolsó sorban kedvezőbb ára miatt. Összetettebb minták vizsgálatára az LC-MS/MS azonban sokkal alkalmasabb, mint a MALDI-TOF, mivel az analízis során számos szekvencia információt hordozó fragmentációs (MS/MS) spektrum keletkezik. Az értekezésben a marha agyszövetből izolált tubulin polimerizációját elősegítő fehérje (TPPP/p25, Tubulin Polymerization Promoting Protein, $M_w=25$ kDa) kölcsönható partnereinek és *Streptomyces griseus* (gram-pozitív baktérium) fajból származó fehérjék legfőképpen MALDI-TOF tömegspektrométerrel végzett azonosítását említem meg. Az utóbbi munkában a konkrét feladatom a vad típusú *Streptomyces griseus* törzs (B2682), az A-faktort nem termelő AFN jelű törzs és az AFN mutáns transzformánsának, azaz az AFN/pSGF4 transzformáns fehérje expressziójának összehasonlítása volt. Az AFN/pSGF4 transzformánsban a C-faktor szignál proteint/molekulát (Signaling Protein Factor C) expresszáltattak. A projekt során a feladatom ezen törzsek fehérjeprofíljában különbséget mutató fehérjék tömegspektrometriás analízise volt. A *Streptomyces griseus* fajból származó minták azonosításának nehézségét az jelentette, hogy az NCBI (és minden egyéb nyilvánosan

hozzáférhető) adatbázis az adott fajra nézve nagyon hiányos volt, továbbá a készülékek sem biztosítottak *de novo* szekvenálásra alkalmas adatokat.

II. ***Fehérjék (relatív vagy abszolút) kvantitatív analízise:*** A kvantitatív vizsgálatok elengedhetetlenek a biológiai folyamatok megértésében. A fehérje mennyiségi változásai összefüggésben lehetnek fejlődési állapottal, gyógyszeres kezeléssel, betegséggel, vagy a sejtciklus állapotával, stb. A mintában lévő komponens mennyisége és az ion intenzitása között azonban nincs egyértelmű összefüggés. Egy adott komponenshez tartozó mért jel intenzitását nagyon sok minden befolyásolja (szerkezet, hidrofóbicitás, bázicitás, töltés stb.), nem utolsósorban pedig a mintában jelenlévő minden egyéb komponens. Ezért a tömegspektrometria alapvetően nem kvantitatív módszer, de megfelelő trükkökkel azzá tehető. Munkám során a kvantitatív vizsgálatok csak nagyon kis szeletével, frakcionálatlan elegyek MALDI-TOF MS alapú mennyiségi meghatározásának tanulmányozásával foglalkoztam. Ezt az analitikai technikát gyakran alkalmazzák frakcionálatlan elegyek kvantitatív vizsgálatára, továbbá pl. sejtek, szövet-szeletek közvetlen tanulmányozására is. Azt vizsgáltam, hogy mennyiben jogos és megbízható a MALDI-TOF kvantitatív analízisekben való alkalmazása. Ezen kérdések megválaszolása és a megbízhatóság kifejezése eltérő komplexitású minták sorozatméréseinek feldolgozásával és statisztikai kiértékelésével történt.

III. ***Poszt-transzlációs módosítások (PTMek) tanulmányozása:*** Az irodalomban közel 500 poszt-transzlációs módosítás ismert. A jelenlévő a genomból mai tudásunk alapján nem megjósolható. PTM-ek például a diszulfid-hidak, az oxidáció, az acetilezés, a metilezés, a foszforiláció, a szulfatálás, a glikoziláció, a keresztkötések és az ubiquitinálás. A kovalens módosítások a fehérjék biológiai sajátosságának változása mellett a fizikai tulajdonságok megváltozásával is járhatnak: valamilyen mértékben módosulhatnak a peptid kromatográfiás tulajdonságai, MS viselkedése, azaz detektálhatósága, fragmentálódási tulajdonságai. Sok kovalens módosítás a fehérjepopulációnak csak egy részét, gyakran csak nagyon kis töredékét érinti (<néhány %). Az alacsony szinten előforduló (rendszerint dinamikus) módosítások vizsgálatánál az MS analízist megelőzően az adott módosításra kidolgozott dúsítási eljárást (ha van ilyen) célszerű alkalmazni, hogy a módosított peptideket

detektálhassuk. Munkám során bizonyos fehérjék [humán DNS polimeráz ióta, DNS polimeráz éta, Werner helicase interacting protein (ATPase WRNIP1), és élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) Rad5 protein) ubiquitinálásának tanulmányozásával foglalkoztam. A módosított peptid dúsítására egyelőre nincs megfelelő eljárás, ezért célzott tömegspektrometriás analízissel próbálkoztam.

Célkitűzések

I. *Fehérjeazonosítás:*

- Marha agyszövetből izolált tubulin polimerizációját elősegítő fehérje (TPPP/p25) kölcsönható partnereinek azonosítása.
- A *Streptomyces griseus* vad típusú törzsének, A-faktort nem termelő mutánsának és az AFN/pSGF4 transzformáns fehérjeprofилban különbséget mutató fehérjék azonosítása, elsősorban MALDI-TOF tömegspektrometriás analízissel.

II. *Fehérjék kvantitatív analízise:*

Munkám során az egyik fő feladatomban a MALDI-TOF tömegspektrometria kvantitatív felhasználhatóságának a vizsgálata, a kvantitatív mérések megbízhatóságának a tanulmányozása volt. A vizsgálatok/mérések eltérő összetételű rendszerek felhasználásával történtek. A mennyiségi meghatározások során kapott eredmények pontosságának és megbízhatóságának jellemzése statisztikai analízissel történt.

III. *Poszt-transzlációs módosítások tanulmányozása:*

A következő fehérjék esetében az ubiquitinálás tényének bizonyítása és a módosítás helyének pontos meghatározása volt a cél: humán DNS polimeráz α , DNS polimeráz β , Werner helicase interacting protein és élesztő Rad5 protein.

Alkalmazott módszerek

A fehérjék enzimatis emésztése leggyakrabban gélben, tripszin alkalmazásával történt. Egyes esetekben brómcíános emésztésre volt szükség, oldatban és gélben egyaránt.

Az emésztmények fordított fázisú, C₁₈ ZIP-TIP tisztítása, amennyiben szükség volt rá.

A minták analízise MALDI-TOF és/vagy LC-MS/MS tömegspektrometriás módszerekkel történt.

MALDI-TOF MS mérések során a minta felviteléhez “dried-droplet” módszert alkalmaztunk és a mérések refletron módban történtek.

Az LC-MS/MS analízis során fordított fázisú kromatográfia alkalmazása.

Használt készülékek:

Bruker Reflex III MALDI-TOF tömegspektrométer

Agilent 1100 nanoHPLC rendszerrel on-line kapcsolt Agilent XCT Plus ioncsapda

A MALDI-TOF kvantitatív jellegének vizsgálata során a mérési eredményeken statisztikai módszerek alkalmazása: varianciaanalízis, regresszióanalízis, F-próba, t-próba, konfidencia intervallum és inverz konfidencia határok meghatározása.

Legfontosabb eredmények

I. *Fehérjeazonosítás:*

1. A számos meghatározott fehérje közül jelentős szerepe a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase-nak (GAPDH) és az elongációs faktornak van.
2. A C faktor A-faktort nem termelő *Streptomyces griseus* mutánsban történő expressziója a szekretált fehérjék közül legalább 50 fehérje expressziójának jelentős mértékű változását eredményezte (kvantitatív összehasonlítás 2D-elektromforézissel). Ugyanakkor az NCBI (és minden egyéb nyilvánosan hozzáférhető) adatbázis *Streptomyces griseus*-ra nézve nagymértékben hiányos volt, így a kutatás kezdetén csak 9 fehérje azonosítását tette lehetővé. A 9 azonosított fehérje közül négy az A-faktor regulon tagja. A maradék 5 pedig olyan fehérje, amelyeket valószínűleg szintén A-faktor regulál, mert a génjeik promóter régiójában AdpA kötő hely van.
3. A *Streptomyces griseus* genomiális adatbázis publikussá tételét követően további 20 fehérjét sikerült azonosítani (a kézirat előkészületben).

II. *Fehérjék kvantitatív analízise:*

Peptidek komplex mintákban történő mennyiségi meghatározását végeztem, ismert koncentrációjú referenciamolekulák segítségével. A mérések megbízhatóságát, illetve annak hiányát statisztikai módszerekkel értékeltem.

1. A kalibrációs görbék segítségével számolt peptidkoncentrációk megbízhatóságának vizsgálatára egy új paramétert, az inverz konfidencia határt vezettem be.
2. A vizsgált rendszerben a számított peptidkoncentrációk pontossága és reprodukálhatósága is elfogadhatatlanul alacsony volt.
3. Amennyiben a referenciamolekula a vizsgált peptid stabil izotóppal jelölt analógja volt, úgy a számított peptidkoncentrációk reprodukálhatósága számottevően, pontossága pedig mérsékelten javult. Ez a javulás azonban csak a 0,5-5 koncentráció-arányoknál teljesült, a vizsgált és a jelölt peptidekre vonatkoztatva.

4. Ezért minimum kétlépéses kalibrációt javaslok kvantitatív meghatározásokra: az elsőt a nagyságrend becslésére, a másodikat a pontos meghatározásra.
5. Kimutattam, hogy a minta összetételének már kismértékű változása a kalibrációs egyenes meredekségét szignifikáns mértékben módosította, ami jelzi a külső kalibráció pontatlanságát.
6. A számított koncentráció-arány pontossága javítható a kalibrációs görbe pontjai számának növelésével ($n_{\min} = 8-10$ minden koncentráció-aránynál), több lézerlövés elvégzésével (min. 1000/spot), illetve azon mérések számának (N') a növelésével, amelyek az ismeretlen koncentráció-arány (X') meghatározására szolgálnak.
7. A kalibrációs egyenest minden mérési pont felhasználásával kell illeszteni, nem csupán az átlagértékekre, így valós képet kaphatunk annak megbízhatóságáról, amit az R^2 érték és a konfidencia határok jeleznek.
8. A vizsgált peptid számított koncentrációjának inverz konfidencia határait minden esetben javaslom kiszámolni és feltüntetni

III. *Poszt-transzlációs módosítások vizsgálata:*

Mind a négy vizsgált fehérje esetében a poszt-transzlációs módosítást, az ubiquitinálást a spektrumokban jelenlévő ubiquitin peptidek igazolták. A módosítás pontos helyének meghatározására célzott MS/MS analízist alkalmaztam, egyelőre sikertelenül; részben a megfelelő készülék hiányában. Azonban minden fehérje esetében jelentős mértékben leszűkítettem a lehetséges Lys oldalláncoknak a számát, ahol a poszt-transzlációs módosítás történhetett.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Medzihradzky F. Katalinnak Ph.D. munkám vezetését, hasznos tanácsait és építő kritikáit, amelyekkel egyben segítette fejlődésemet a tömegspektrometria területén. Dr. Fehér Tamásnak a statisztikai kiértékelésekben nyújtott segítségét, Dr. Hunyadi-Gulyás Évának, Klement Évának és Dr. Darula Zsuzsának munkám kezdetén a betanítást, a későbbiekben pedig hasznos tanácsaikat, és segítségüket. Továbbá szeretnék köszönetet mondani Dr. Vizler Csabának.

Szeretnék köszönetet mondani együttműködő partnereinknek: Dr. Ovádi Juditnak, Oláh Juditnak, Dr. Biró Sándornak, Dr. Birkó Zsuzsannának, Dr. Unk Ildikónak és Dr. Haracska Lajosnak és Burkovics Péternek.

Köszönöm a Richter Gedeon Centenárium Alapítványnak az anyagi támogatást munkám befejezéséhez. Köszönöm az SzBK főigazgatójának, Dr. Dudits Dénesnek és a Főigazgatói Csoport adminisztratív vezetőjének, Dr. Páy Anikónak, hogy támogatást nyújtottak ahhoz, hogy kutatómunkámat az SzBK-ban végezhessem.

Köszönöm a Bio-Science Kft.-nek és azon belül Süle Andreának, hogy a munkámhoz szükséges Heavy PeptideTM AQUA Demo Kit-et biztosította.

Végül szeretnék köszönetet mondani Dr. Kovács Lajosnak és Dr. Paragi Gábornak, akik Ph.D. munkám kezdetén segítették szakmai fejlődésemet.

Publikációs lista

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények

1. Oláh J, Tokési N, Vincze O, Horváth I, Lehotzky A, Erdei A, **Szájli E**, Medzihradzsky KF, Orosz F, Kovács GG, Ovádi J. *Interaction of TPPP/p25 protein with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and their colocalization in Lewy bodies*, FEBS Lett. 2006 Oct 30; 580 (25):5807-14. **IF:** 3.372 (2006)
2. Birkó Z, Bialek S, Buzás K, **Szájli E**, Traag BA, Medzihradzsky KF, Rigali S, Vijgenboom E, Penyige A, Kele Z, van Wezel GP, Biró S., *The secreted signaling protein factor C triggers the A-factor response regulon in Streptomyces griseus: overlapping signaling routes*, Mol Cell Proteomics. 2007 Jul; 6 (7):1248-56. **IF:** 9.425 (2007)
3. **Emília Szájli**, Tamás Fehér, and Katalin F. Medzihradzsky, *Investigating the Quantitative Nature of MALDI-TOF MS*, Mol Cell Proteomics 2008: 2410–2418 First Published on July 24, 2008 doi:10.1074/ mcp.M800108- MCP 200 **IF:** 9.425 (2007)

Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények

1. **Szajli E**, Paragi G, Kovacs L., *A study of H-bonding of 3- and 5-substituted 6-aminouracils in duplex and triplex structures*, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2005; 24 (5-7): 907-10. **IF:** 0.565 (2005)
2. Gábor Paragi, **Emília Szájli**, Ferenc Bogár, Lajos Kovács, Célia Fonseca Guerra and F. Matthias Bickelhaupt, *Hydrogen bonding of 3- and 5-methyl-6-aminouracil with natural DNA bases*, New Journal of Chemistry, 2008. **IF:** 2.651 (2007)

Konferencia poszterek

- 2003.06.26-28: **Szájli Emília**, Dr. Schneider Gyula, *Szteroid-karbamátok sztereoselektív előállítás*a Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, Szerves és Gyógyszerkémiai szekció.
- 2003.11.6-7: Ágota Szájli, **Emília Szájli**, János Wölfling, Gyula Schneider, Temesvár: The Vth International Symposium "Young people and multidisciplinary research". *Synthesis of estrone derivatives with halogen content*
- 2004.09.12-16: **Emília Szájli**, Lajos Kovács, Gábor Paragi, *A study of H-bonding of 3- and 5-substituted 6-aminouracils in duplex and triplex structures*, XVI International Roundtable, International Society of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Minneapolis, USA.
- 2006.08.27-09.01.: **Szájli Emília**, Medzihradzky KF, 17th International Mass Spectrometry Conference, Prága, *Quantitative measurements using MALDI-TOF mass spectrometry*
- 2007.05.06-10. Z. Darula, E. Klement, E. Hunyadi-Gulyas, A. Csorba, K. Buzas, **E. Szájli** and K.F. Medzihradzky, *Unexpected guests in protein identification by mass spectrometry*, 25th Informal Meeting on Mass Spectrometry (25th IMMS), Nyíregyháza-Sóstó, Hungary

Előadások

- 2002.10.28-30: **Szájli Emília**, Dr. Schneider Gyula, *Gyűrűs szteroid-karbonátok sztereoselektív képződése*. XXV. Kémiai Előadói Napok, Szintetikus szerves kémiai szekció;
- 2002.11.28.: **Szájli Emília**, Dr. Schneider Gyula, *Gyűrűs szteroid-karbonátok sztereoselektív képződése*. Helyi Tudományos Diákköri Konferencia, Szeged: III. Helyezés.
- 2003, április 16: **Szájli Emília**, Dr. Schneider Gyula, *Gyűrűs szteroid-karbonátok sztereoselektív képződése*. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Kémiai és Vegyipari Szekció, Budapest: III. Helyezés.

- 2003.11.20: G. Paragi, E. Szájli, B. Penke, Z. Timár: *Ab initio calculations on dimer and triplex DNA systems*. Dep. of Theoret and Phys. Chemistry, Fac. of Sci. Masaryk Univ.Brno,
- 2004.03.25-26. G. Paragi, E. Szájli, B. Penke, Z. Timár: *Hidrogén-híd kötés vizsgálata ab initio (HF és DFT) módszerekkel DNS Bázisok dimer és triplex rendszereiben*. MKE Szerves- és Gyógyszerkémiai Szakosztályának QSAR és Modelllezési Szakcsoportja és az MTA Szegedi Akadémiai Bizottságának Kemometria és Molekulamodellezés Munkabizottság által szervezett közös tudományos ülése, Szeged: Elméleti Kémiai szekció
2004. május: **Szájli Emília**, Dr. Kovács Lajos, Paragi Gábor, *Hidrogénkötés tanulmányozása 3- és 5- szubsztituált 6-aminouracil dimer és triplex szerkezeteiben*. Peptidmunkabizottsági ülés, Balatonszemes.
- 2007.08.25-27: **Szájli Emília**, Dr. Medzihradszky Fölkl Katalin, *Látjuk? Nem látjuk? Jól látjuk? Komplex minták MALDI-TOF MS analízise*. A Magyar Proteomikai Társaság 2007. évi Vándorgyűlése (II.), Debrecen.