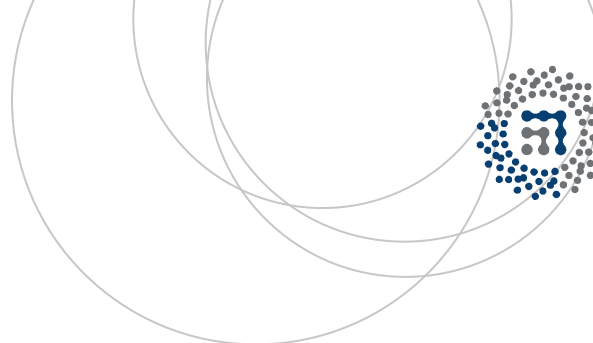


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gratu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua / Grado en Bioquímica y Biología
molecular

Nup93: informazio-bilketa eta proteomika ituratuaren bidezko esperimenduaren diseinua

Egilea/Autor:
Erik Aostri
Zuzendaria/Director/a:
Dr. Jesus M^a Arizmendi



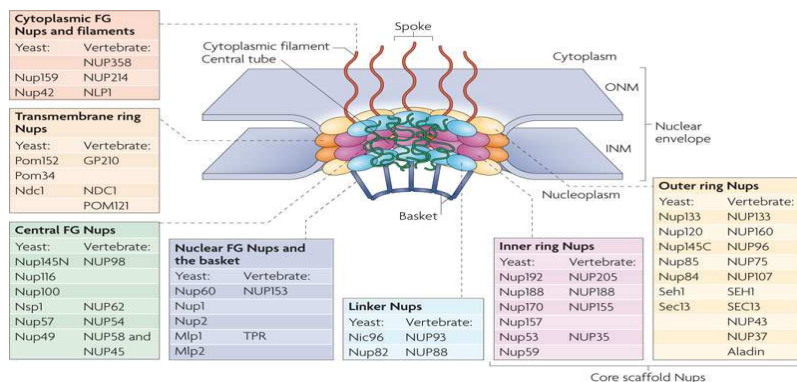
Aurkibidea

1. Sarrera.....	2
1.1. Helburuak.....	5
2. Metodologia.....	5
2.1. Peptidoen proteotipikoen aukeraketa.....	5
2.2. Zelulen lisia eta proteinen digeritzea.....	6
2.3. Peptido estandarren eta laginen prestaketa.....	6
2.3.1. Masa espektrometria eta datuen analisisa.....	7
3. Emaitzak eta eztabaida.....	8
3.1. Peptido proteotipikoen aukeraketa.....	8
3.2. Peptido estandarren karakterizazioa.....	10
3.3. Lagin konplexuaren peptido endogenoen eta estandarren analisisa.....	11
4. Ondorioak.....	14
5. Bibliografia.....	14

1. Sarrera

Biomarkatzailea egoera biologikoaren adierazle neurgarria da, neurri fisiologikoko emendatua edo murriztua ager daitekeena. Biomedikuntzan egoera biologiko interesgarriena patologikoa da, hau da, gizakia gaixorik dagoenean. Kasu horretan biomarkatzailea kaltetutako edo eraldatutako zelulek ekoiztutako edota askatutako molekula izan daiteke. Beraz, molekula horiek ioiak, gluzidoak, proteinak edo beste edozein motatako molekulak izan daitezke. Egoerarik idealenean molekula horiek odolean edo gernuan egongo lirateke, baina minbiziaren kasuan, adibidez, tumorean pilatuta dagoen molekula ere izan daiteke. Horrek proteomika ituratuarekiko interesa piztu du biomarkatzaile proteikoak lagin ugarietan monitorizatu ditzakeelako. Hain nabaria izan da proteomika ituratuaren gorakada, 2012. urtean *Nature Methods* aldizkariak *Method of the year* errekonozimendua eman ziola. Bereziki itxaropentsua dirudi tumoreetan gain-adierazitako proteinen monitorizazioa minbizien diagnostiko goiztiarrerako. Horregatik lan honetan proteomika ituraturako protokolo bat diseinatu da, Nup93 nukleoporina lagin konplexuetan identifikatu eta kuantifikatu ahal izateko.

Nup93 proteina poro nuklearraren konplexuko (NPC) osagaia da, 93 KDa eta 819 aminoazidoetako nukleoporina bat hain zuzen ere. Gizakietan NPC konplexuak 60 MDa ditu eta bere muina 4 eratzunez eratuta dago, 2 kanpoko aldean eta beste 2 barnean. Muina eratzeko eratzunetako nukleoporinak mintz zeharreko nukleoporinekin batera elkartzen dira. Gune zentral horretatik kanpo, FP nukleoporinek (adibidez, Nup62 azpikonplexua) poroaren saski nuklearra eratzen dute garraioa kontrolatzeko. Azkenik, poroaren saskia eratzen duten FP nukleoporinak eta konplexuaren muina eratzen duten nukleoporinak konektatzeko esteka-nukleoporinak daude (**1. irudia**; Strambio-De-Castillia *et al.*, 2010). Nukleoporina hauen artean gure Nup93-a dago, eta bere funtzioa ezinbestekoa dirudi konplexuaren mihiztadurarako.



1. irudia. NPC konplexuaren atalak eta nukleoporinen banaketa horietako atal bakoitzean.



NPC konplexua mintz nuklearraren atezaina da, batez ere azido nukleikoen irteera bermatzen duelako. NPC bakoitzaren eraketan eta mantenuan 30 nukleoporina ezberdinen kopia ugari parte hartzen dute. Nukleoporina hauek azpikonplexu diskretuak eratzen dituzte, mitosian banatzen ez direnak. Izan ere, mitosian mintz nuklearrarekin batera NPC konplexuak ere desagiten dira, baina nukleoporina ezberdinetan banatu beharrean azpikonplexuetan zatitzen dira ondorengo mihiztadura errazteko. Azpikonplexu horietako bat Nup93-rena da eta beste hiru nukleoporinen kopia ezberdinekin eratuta dago. Proteina horiek Nup205, Nup188 eta Nup53 dira (Hawryluk-Gara *et al.*, 2005), baina Nup93-rekin karakterizatutako interakzio zuzen bakarra Nup205-arekin izan da. Horretaz gain, Nup93 azpikonplexuaren partaide ez den beste azpikonplexu batekiko interakzioa ere aztertu izan da, Nup62-rekin hain zuzen ere. (Galy *et al.*, 2003).

Nup93-ren egitura karakterizatuta ez dagoen arren, *S. cerevisiae* legamiaren Nic96 homologoarena ezaguna da. Homologo horrek nagusiki alfa helizez eraturik dago eta sekuentzia mailako antzekotasun altua dela eta, aipatutako egitura Nup93 proteinari eta bestelako proteina homologoei estrapolatu daiteke (Jeudy eta Schwartz, 2007). Zehazki, Nic96 homologoak 30 alfa helize ditu, guztiz karakterizatuta ez dauden ukondoez konektatuta. Proteina-proteina interakzioak erregulatzeko 12 eta 18 helizeen artean TPR erako domeinua eratzen da.

Nukleoporina disolbagarriek potentzialtasun handia daukate biomarkatzaile modura erabiltzeko, bai serumean neurtuta edo ehunen biopsietan aztertuz. Izan ere, nukleoporinen adierazpen eraldatua ikusi izan da gaixotasun autoimmuneetan, gaixotasun kardiobaskularretan eta minbizian. Adibidez, Tarazón eta bere taldekideek (2012) Nup93, Nup160 eta Nup153 nukleoporinen gain-adierazpena deskribatu zuten bihotzekoa, iskemia eta kardiomiopatia dilatatua jasan zuten gaixoetan. Hala ere, kasu horretan nukleoporinen gain-adierazpena ez da gaixotasunaren erakusle, ondorioa baizik. Bestetik, nabaria da tumore zelulekin eginiko saiakera ezberdinetan NPCaren konposaketa guztiz eraldatuta dagoela (Tran *et al.*, 2011). Gainera, tumore gaiztoetan metabolismo orokorra emendatuta dagoenez zelulenzako beharrezko da NPC konplexu gehiago edukitzea mintz nuklearraren zeharreko garraioa emendatzeko. Horregatik nukleoporina batzuen kasuan posiblea izan da tumorearen garapena eta agresibitatea nukleoporinen adierazpenarekin erlazionatzea, eta zehazki beste esteka-nukleoporina batena (Zhao *et al.*, 2011). Hor kokatu daiteke proteomikaren garrantzia, hain zuzen ere proteina horiek kuantifikatzeko.



Orain arte proteomikaren estrategiarik erabiliena *shotgun*-a izan da. Honako estrategia hau 80ko hamarkadan garatu zen garai hartako tekniken mugen ondorioz. Izan ere, 1975ean 2D-ko elektroforesia asmatu bazen ere, kantitate txikian zeuden molekulak nekez detektatzen zituen. Aldiz, *shotgun* estrategiak *Liquid chromatography-Tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)* muntaia erabiliz milaka peptidoen MS/MS espektroak lor ditzake, peptidoen datu baseekin konparatuko dituenak. Ondorioz, lagin konplexu batean dauden milaka proteina identifikatu ahal izango dira. Honek proteomaren perfil dinamikoa eraikitzea ahalbidetzen du inongo hipotesirik gabe.

Egun analisi ituratuak indarra hartu du ikertzaileari intereseko proteina populazioa soilik aztertzea baimentzen diolako. Honako hau posiblea da aztertuko den peptido kopurua mugatzen delako m/z -ren araberrako filtrazioari esker. Aldi berean, peptido kopuruaren murrizketagatik datuen analisia errazagoa da eta lagin gehiagotan intereseko proteina monitorizatu daiteke. Gainera, sentikortasuna nabarmenki emendatzen da seinale intentsuenak analizatzera mugatzen ez delako. *shotgun* estrategian ez bezala, proteomika ituratuak galdera konkretuei erantzuten die eta horregatik hipotesiaren beharra dauka (Picotti *et al.*, 2013) .

Proteomika ituratua egiteko metodo erabiliena *Selected reaction monitoring (SRM)* da. SRM saiakeretan peptidoa zein horren zatiki konkretuak filtratzen dira bi quadrupoloren bitartez. Honako estrategia hau QqQ motako masa espektrometroekin gauzatzen da eta proteomika ituratu kuantitatiboaren urrezko estandar modura kontsideratu daiteke (Lange *et al.*, 2008). Aukeraketa 2 maila ezberdinetan egin arren analizatzailearen bereizmena zalantzan jarri izan da azken urteotan. Horretaz gain, metodologia honek trantsizioen aukeraketa egitera behartzen du eta horrek metodoa optimizatzeko lan eta denbora asko eskatzen du. Horregatik azkeneko urteotan ordeztu diseinuen bilaketa piztu egin da. Bilaketa horretan *Parallel reaction monitoring (PRM)* teknika agertu zen, saiakeren diseinua nabarmenki errazten duenak peptidoaren zatiki guztiak paraleloki detektatzerakoan (Peterson *et al.*, 2012). Azkeneko estrategia hau tipikoki Quadrupolo-Orbitrap sistema hibridoarekin gauzatzen da. Izan ere, Orbitrap analizatzaileak *high resolution/ accurate mass (HR/AM)* analisia ahalbidetzen ditu.

Aipatutako ezberdintasunak nabariak diren arren, *shotgun* estrategia eta estrategia ituratua osagarriak izan daitezke. Izan ere, proteina konkretu bat masa espektrometria zidentifikatzea eta kuantifikatzea nahiko balitz komenigarria litzateke lehenik eta behin proteina horren peptidoren bat identifikatuta egotea. Horren garrantzia ez da peptido konkretu horren m/z ratioa zehaztea,

masa espektrometroan ondo detektatzen dela ziurtatzea baizik. Hortaz, *shotgun* estrategia aurrepausutzat hartzeak estrategia ituratuaren eraginkortasuna esponentzialki emendatzen du.

Proteomikak modu ezberdinak ditu lagin ezberdinetako proteina baten kantitatea erlatiboki zein modu absolutuan zehazteko. Metodo gehienak masa espektrometriak isotopoak bereizteko duen gaitasunean oinarritzen dira. Gaur egun isotopo astunekin markatutako peptidoak zuzenean erosten dira norberak aukeratutako sekuentziarekin eta purifikazio mailarekin. Erabilitako peptido estandarren purutasuna oso altua bada eta zehazki kuantifikatuak badaude, peptido endogenoaren kuantifikazio absolutua baimentzen da. Proiektu honetan kuantifikazio erlatiborako metodoa diseinatu nahi da hain puruak ez diren peptido merkeagoak erabiliz.

1.1. Helburuak

Lan honek bi atal ditu, batetik alde teorikoa eta bestetik esperimentalak. Alde teorikoaren helburua Nup93 proteinari buruzko informazioa biltzea izan da. Horren baitan proteinaren zeregina eta biomarkatzailea izateko aukera dagoen ala ez baieztatzea egongo litzateke.

Alde esperimentalari dagokionez, protokolo espezifiko bat diseinatu nahi da PRMz Nup93 kuantifikatu ahal izateko. Horretarako HEK 293T zeluletan Nup93 proteina monitorizatuko da, alde aurretik aukeratutako eta markatutako peptido proteotipikoak erabiliz. Era horretan, PRM teknika peptido endogenoak analizatzeko gai izango dela lan honen hipotesia da.

2. Metodologia

2.1. Peptido proteotipikoen aukeraketa

Proteinaren ordezkariak izango diren peptidoak aukeratzeko lehenengo pausua *shotgun* estrategiarekin identifikatutako Nup93-ren peptidoak biltzea izan zen. Horretarako, EHUko Proteomikako Zerbitzuak egindako *shotgun* saiakeren artean Nup93 proteinatik identifikatutako peptidoak bilatu ziren. Era horretan ziurtatu zen abiapuntutzat hartutako peptidoak masa espektrometria zidentifikagarriak zirela. Behin hori eginda, peptidoek proteinarekiko zuten espezifikotasuna aztertzeke haien sekuentziak BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) algoritmoarekin aztertu ziren. Berriz ere espezifikotasuna testatzeko, peptido bakoitzaren sekuentzia zehatza Peptide Atlas (<http://www.peptideatlas.org/>) eta ProteomicsDB (<https://www.proteomicsdb.org/>) datu baseetan bilatu ziren.

2.2. Zelulen lisia eta proteinen digeritzea

Nup93 proteina HEK (Human Embryonic Kidney) 293T zeluletan identifikatu eta kuantifikatzeko aukera dagoen zehaztu nahi zen. Horretarako, zelula horiek FASP (*filter-aided sample preparation*, Wisniewski *et al.*, 2009) metodologiaz purifikatu ziren, hau da, lisi-tanpoiak ultra-filtrazioarekin konbinatuz. Protokolo honek errektibo modura SDT (% 4 SDS eta 0,1 M DTT) lisi-tanpoia, 50 nM IAA, 50 nM amonio bikarbonatoa eta 8 M urea erabiltzen ditu. Hori guztia kontuan hartuta, FASP protokoloa 5 pausutan labur daiteke: lisia, pisu molekula baxuko molekulen baztertzea, tiol taldeen karboamidometilazioa, proteinen digeritzea eta peptidoen eluzioa.

Lortutako lisatua tripsinarekin 1:50 proportzioan inkubatu behar denez, zeluletatik eratorritako proteina kantitatea kalkulatu zen. Proteina kantitatea zehazteko FASPan erabilitako detergentearekin bateragarria den Pierce BCA Protein Assay Kit-a erabili zen. Neurketen arabera 5 milioi zelulen erauzkinaren 12,5 µL 62,5 µL SDTrekin nahastatu ziren, gero lisatu horretako 30 µL-ko 2 lagin digeritzeko. Beraz, lagin bakoitzari 4 µg tripsina gehitu zitzaion guztira 200 µg proteina zeudelako. Lisatua tripsinarekin 16 orduz inkubatu ondoren, prestakina C18 zutabetik igaro zen laginari gatzak kentzeko eta horrekin masa espektrometroarekiko bateragarria egiteko. Zutabetik erauzitako 100 µg proteina 50 µL-tan suspenditu ziren 2 µg/µL-ko kontzentrazioa lortzeko.

2.3. Peptido estandarren eta laginen prestaketa

Estandar modura Thermo Scientific enpresari erositako eta isotopo astunekin markatutako lisina edo arginina daramaten 5 peptidoak hauek dira: NLQEIQQAGER, LLSPVVPQISAPQSNK, EALQYFYFLR, MAEEYHR eta LVPLNQESVEER. Peptido estandarrek 400 µL-ko laginetan dotoz eta bolumen horren %50a azetonitriloa da. Azetonitriloak peptidoak HPLC zutabera itsastea eragozten duelako hasierako laginak % 0,1 azido formikoarekin 50 aldiz diluitu ziren. Honako diluzioa hau erabili zen emaitzetan aipatzen diren diluzio serieak egiteko, beraz diluzio serieetako lagin kontzentratuena hau izango da. Diluzio serieak egiteko bi nahasketa ezberdin egin ziren, bata peptido estandar soilak zeramatzana eta besteak peptido estandarrek zelulen lisatuarekin nahastatua. Peptido estandar soilen analisirako 1/50 disoluzioa hamarnaka 5 aldiz diluitu zen, 10⁵-era heldu arte (guztira 6 lagin). Lehenengo nahasketaren emaitzak ikusita,

bigarren esperimenturako peptido estandarren diluzio bera berriz ere hamarnaka diluitu zen baina oraingo honetan jatorrizko lagina 10^4 aldiz diluitu arte. Horrez gain, estandarren bigarren diluzio serieko lagin bakoitzaren 20 μL lisatuaren 1,5 μg peptidorekin nahastatu ziren. Nahastatu ondoren, analisirako beharrezkoa den bolumenera heltzeko 5 laginei % 0,1 azido formiko gehitu zitzaizen 30 μL -ra heldu arte.

2.3.1 Masa espektrometria eta datuen analisisia

Masa espektrometriako esperimentu guztiak EHUko Proteomikako Zerbitzuan egin ziren, Thermo Scientific etxeko nanoEasy 1000 kromatografia zutabeari konektatutako Q-exactive masa espektrometroa erabiliz. Era horretan, masa espektrometroarekin *Shotgun* eta PRM analisiak (**1. taula**) egin ziren peptido estandar soilak eta peptido estandarrak zelulen lisaturekin batera aztertzeko. Analisi horietatik eratorritako datuak aztertzeko nagusiki Proteome Discoverer (Thermo Scientific), Xcalibur (Thermo Scientific) eta Skyline (MacLean *et al.*, 2010) programak erabili ziren. Proteome Discoverer programarekin lagineko proteinak identifikatu daitezke, erretentzio denbora bezalako beste ezaugarri batzuekin batera. Baliabide informatiko honek datu baseetan bildutako peptidoen espektro teorikoak masa espektro esperimentalekin konparatzen ditu SEQUEST motorra erabiliz. Erreferentzia datu basetzat Uniprot-eko giza datu basea aukeratu zen. Peptidoak laginean identifikatzen zirela ziurtatu ostean, Xcalibur tresnarekin peptido bakoitzari zegokion piko intentsuenaren intentsitatea, zabalera eta erretentzio denbora kalkulatu ziren. Azkenik, PRMaren kromatogramako pikoen azalera kalkulatzeko, eta horrekin tarte dinamikoak egiteko, Skyline baliabide informatikoa erabili zen. Azalera horiek 3 y zatiki intentsuenen pikoen azalera gehituz lortu ziren.

	Shotgun		PRM
	MS	MS ²	
Erresoluzioa	70 000	17 500	17 500
Gradientea	% 0-30: 90 min. % 90-100: 2 min. % 100: 8 min.		% 0-30: 90 min. % 90-100: 2 min. % 100: 8 min.
Aztertutako m/z tartea	300-1850	200-2000	839,480336 (+2), 843,487436 (+2, astuna), 675,348063 (+2), 680,352197 (+2, astuna), 706,87263 (+2), 711,876765 (+2, astuna), 643,32839 (+2), 648,332524 (+2, astuna)
C-trap-ean pilatutako ioi kopurua (AGC)	3E+06	5E+05	5E+05
Analisi-bolumena	2, 5, 10 µL		15 µL

1. taula. *Shotgun* eta PRM analisiak egiteko erabili diren oinarritzko parametroen baloreak.

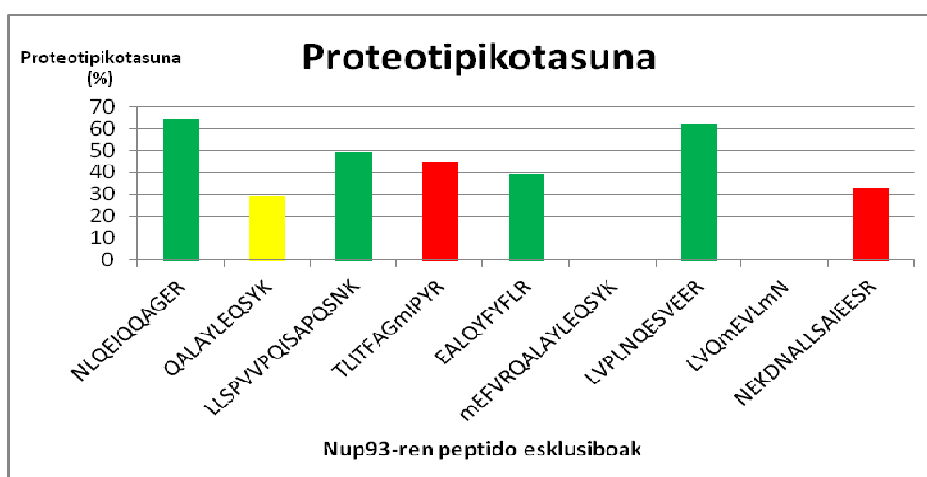
3. Emaitzak eta eztabaida

3.1. Peptido proteotipikoen aukeraketa

Proteina baten ordezkariak izan behar diren peptidoak zenbait baldintza bete behar dituzte identifikaziorako zein kuantifikazio ituraturako. Baldintza horiek nolabait kontzeptu bakar batean biltzeko proteotipikotasunaren kontzeptua sortu zen. Peptido proteotipikoa masa espektrometriaz detektatzeko erraza izatez gain, intereseko proteinarekiko espezifikoa da. Proteotipikotasun horrek biltzen dituen kontzeptuez gain, aldakortasuna ere kontuan hartu beharra dago. Hau da, laginaren prestaketaren zehar eraldaketak jasan ditzaketen aminoazidoak ekidin behar dira. Hori guztia kontuan hartuta, EHUko Proteomika Zerbitzuko *Shotgun* analisisetan identifikatutako Nup93-ren 12 peptidoek hurrengo irizpideetan oinarritutako aukeraketa teorikoa jasan zuten:

- Peptidoaren sekuentzia Nup93-an besterik ez egotea, hau da, proteinarekiko espezifikoa izatea. Aukeraketa egiteko abiapuntua irizpide hau izan zen, beraz beste saiakera batzuetan ikusitako peptido ez espezifikoak jarraian baztertu ziren. Irizpide honi jarraituta hasierako 12ko taldetik 3 peptido baztertu egin ziren.

- Peptidoaren baitan argininarik ezta lisinarik ez agertzea barne mozketak ekiditeko. Hori dela eta, aurreko irizpidea betetzen zuten NEKDNALLSAIEESR eta MEFVRQALAYLEQSYK peptidoak baztertu egin ziren honako irizpide hau ez betetzeagatik. Momentu honetan oraindik 7 peptido zeuden.
- Peptidoaren aldakortasun ahalik eta urrien izatea komeni da. Horrek esan nahi du peptidoak oxidazioa edota fosforilazioa bezalako eraldaketak jasaten dituzten aminoazidoak ez dituela izan behar. Aminoazido hauek sortzen duten aldakortasunak batez ere kuantifikazioa kaltetzen du. Adibidez, metionina oxidatu daiteke eta horrek peptidoaren m/z aldatzen du, baina metioninaren oxidazioa kontrolatzeko zaila denez populazioaren zati bat besterik ez da oxidatuko. Era horretan TLITFAGmYPIR eta LVQmEVLmN peptidoek ez zuten aukeraketa prozesua gainditu, taldea 5 peptido izatera mugatuz. Bestetik, serina zeramaten peptidoak Uniprot-eko informazioari jarraituta ez ziren baztertu fosforilatzen ez zirelako.
- Peptidoaren proteotipikotasuna nahikoa izatea. Horretarako Peptide Atlas eta ProteomicsDB bezalako datu baseetan peptido bakoitza zenbat aldiz identifikatu den behatu daiteke, gero proteina identifikatutako aldiekiko proportzioa ezartzeko (**2. irudia**). Hortik lor daiteken baloreak proteotipikoakotasunari zenbakizko balore bat ematen dio. Irizpide honi jarraituta QALAYLEQSYK alde batera utzi zen.



2. irudia. ProteomicsDB datu basean bildutako maiztasunekin kalkulatutako batezbesteko proteotipikotasuna, ehunekotan adierazia. Irudikatutako peptidoak aurretik *shotgun* estrategiarekin identifikatutakoak dira. Legenda: aukeratutako peptido proteotipikoak (berdez), aldakortasuna eragiten duten aminoazidoak daramaten peptidoak (gorriz), proteotipikotasun nahikorik ez duten peptidoak (horiz).

Aukeraketa prozesu honen ondoren hurrengo peptidoak aukeratu ziren: NLQEIQQAGER, LLSPVVPQISAPQSNK, EALQYFYFLR eta LVPLNQESVEER.

Ezaguna da gene batek proteinaren aldaera ezberdinak kodetu ditzakeela, adibidez gure Nup93-k dituen bi isoforma ezagunak. Proteina beraren isoformak bereiztea kasu askotan erraza ez denez, diseinu honen gaitasun espezifikoa testatu nahi izan zen. Horretarako Nup93-ren isoforma bakoitzarekiko peptido espezifikoa bat bilatu zen. Igo isoformarekiko peptido espezifikoa NLQEIQQAGER da eta jatorrizko *shotgun* saiakera gehienetan identifikatzeaz gain aukeraketa prozesuaren baldintza guztiak bete zituen. Bestalde, Nup93-ren 2. isoformari lehenengo 123 aminoazidoak falta zaizkiolako peptido espezifikoa bakarra du. Beste peptido honen sekuentzia MAEYHR da, eta zoritxarrez ez dago horren arrastorik datu baseetan ezta gure jatorrizko *Shotgun* saiakeretan ere. Ondorioz, peptido honi ez zitzaion aukeraketa prozesu teorikotik igaroarazi, baina argi dago bere proteotipikotasuna eskasa zela.

3.2. Peptido estandarren karakterizazioa

Peptido estandarren erabilerak peptido endogenoen analisirako zenbait abantaila dakartza. Batetik, peptido endogenoaren identifikazioa errazten da bere erretentzio denbora peptido estandarren berdina delako, beraz ezaguna. Gainera, ezaugarri berdintsuak izan arren, masa ezberdina dutelako masa espektrometria bereiz daitezke eta ondorioz barne-estandar modura erabili. Barne estandar baten erabilerak metodoaren normalizazio ahalbidetzen du eta horri esker laginen arteko konparaketak egin daitezke. Are gehiago, peptido estandarren purutasunak altua balira eta zehazki kuantifikatuta baleude, peptido endogenoaren kuantifikazio absolutua egin ahalko litzateke.

Hasteko, 5 peptido estandarrak proportzio berean nahastatu eta *shotgun* metodoarekin analizatu ziren. Analisi honi esker peptidoak identifikatzeaz gain, bakoitzaren erretentzio denbora eta zatiki intentsuenak zehaztu ahal izan ziren. Horrela, *shotgun* analisisian MAEYHR peptidoa identifikatu ez zenez baztertzea erabaki zen. Aurreko atalean aipatu den moduan MAEYHR peptidoak ez ditu baldintza minimoak betetzen eta ziur aski ez da behar bezala ionizatzen, beraz esperotako emaitza bat zen. Hala ere, beste 4 peptidoak fidagarritasun handiz identifikatu ziren 1/50 diluzioan eta haien intentsitateak orekatuak zeuden, hortaz PRMz analizatzeko prest.

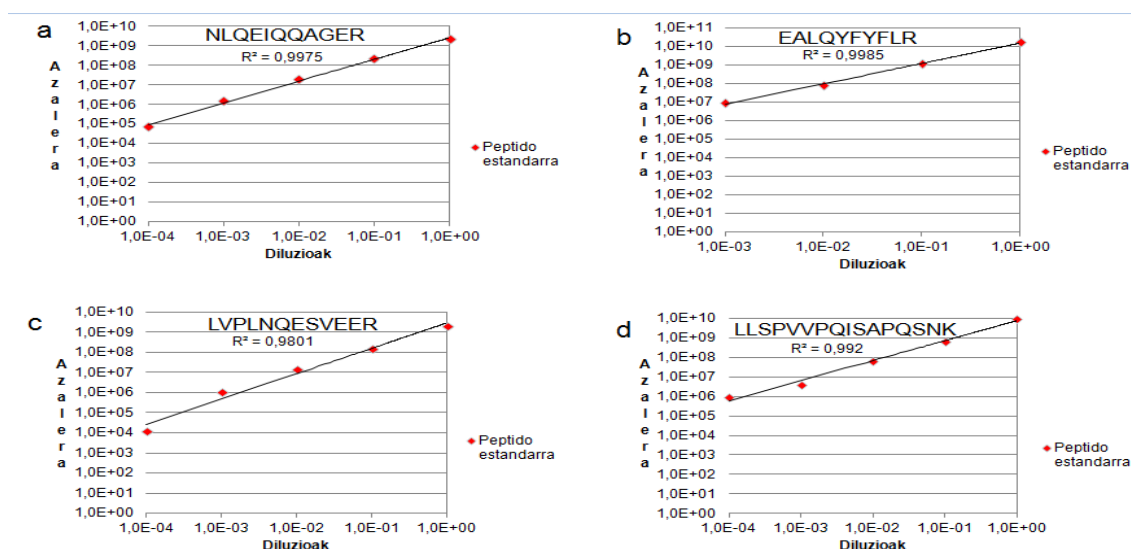
MS analisisian 4 peptidoak identifikatu eta gero, diluzio serieak prestatu ziren euren tarte dinamikoak kalkulatzeko eta PRM metodoa testatzeko. Lehenengo PRM analisi hau egiteko peptido astunen 1/50 diluzioa hamarnaka diluitu zen 1/10⁵-era heldu arte. Peptido astun soilen analisi horretan 3 peptidoren (NLQEIQQAGER, LLSPVVPQISAPQSNK eta LVPLNQESVEER) tarte dinamikoak 4 magnitudera mugatzen ziren. Emaiza horiek teknikaren estandarren parean daude, askoz jota 5 magnitudera luzatu daitekeena (S. Gallien *et al.*, 2012). Aldiz, EALQYFYFLR peptidoaren tarte dinamikoak 2 magnitude soilik estaltzen zituen. Emaiza hauek benetako PRM analisisia prestatzeko besterik ez ziren arren, esan beharra dago kalibraketa-kurben linealtasunak R balore idealetik ($R < 0,99$) aldentuta zeudela. Gainera, azkeneko PRMaren emaitzak hobetu zirela jakinda, ziurtasunez esan daiteke aparatua kalibraketa ezegokia zela momentu hartan. Konkretuki, kromatogramako pikoaren intentsitatearen gorabeherak ikusita HPLCtik datorren diluzioa lainoztatzen duen aparatua behar bezala ez zebilela dirudi. Oszilazio horiek espektroaren pikoaren itxura eraldatzen dute eta ondorioz haien azalera ere kaltetzen da. Gainera, lainoztagailuak sortutako erroreak ez du inolako patroirik jarraitzen eta beraz peptido bakoitzean eragindako errorea ezberdina izango da. Ondorioz, baliteke errore hori EALQYFYFLR peptidoan nabariagoa izatea eta horregatik hasierako seinalea handia izanda, bi aldiz diluitu ondoren seinalea asko ahultzen da.

3.3. Lagin konplexuaren peptido endogenoen eta estandarren analisisa

PRM metodoa lagin konplexuekin funtzionatzen zuela ikusteko peptido estandarren diluzio seriea HEK 293T zelulen erazkinarekin nahastatuta aztertu zen. PRM honen helburua kuantifikazioa posiblea litzatekeela ziurtatzea baino ez da, horregatik merkeagoak diren kuantifikatu gabeko peptido ez puruak erabili izan dira. Beraz, kuantifikazioa egin arren, ez dauka zentzurik zehatza izango ez den balorea ematea.

Metodoetan azaldutakoaren arabera, 1,5 µg proteina zituen frakzionatu gabeko lagin bakoitzari peptido astunen diluzioetariko (5 guztira) bat gehitu zitzaion. Frakzionatu gabeko lagina erabili izana aztertutako matrize biologikoaren konplexutasuna emendatzen du, beraz estaltze ionikoaren bezalako fenomenoak arruntagoak dira. Testuinguru horretan 4 peptidoetatik hiruk 4 magnitudetako tarte dinamikoa erakutsi zuten, baina EALQYFYFLR peptidoa berriz ere magnitude gutxiagoetara mugatu zegoen (**3. irudia**). Izan ere, tarte dinamikoari begira argi dago EALQYFYFLR peptidoak lagin diluituenean zarata altuegiatik edo interferenteren baten

ondorioz linealtasuna galtzen duela (**4. irudia**). Seguruena interferentzia sortzen duen molekularen masa peptidoaren antzekoa da eta lagin diluituenean bere seinalea besteetan baino proportzionalki handiagoa denez bere eragina handiagoa da. Aldiz, ioien kantitate baxuegiaren hipotesia bazter daiteke lagin kontzentratuenean EALQYFYLR peptidoaren seinalea altua delako.

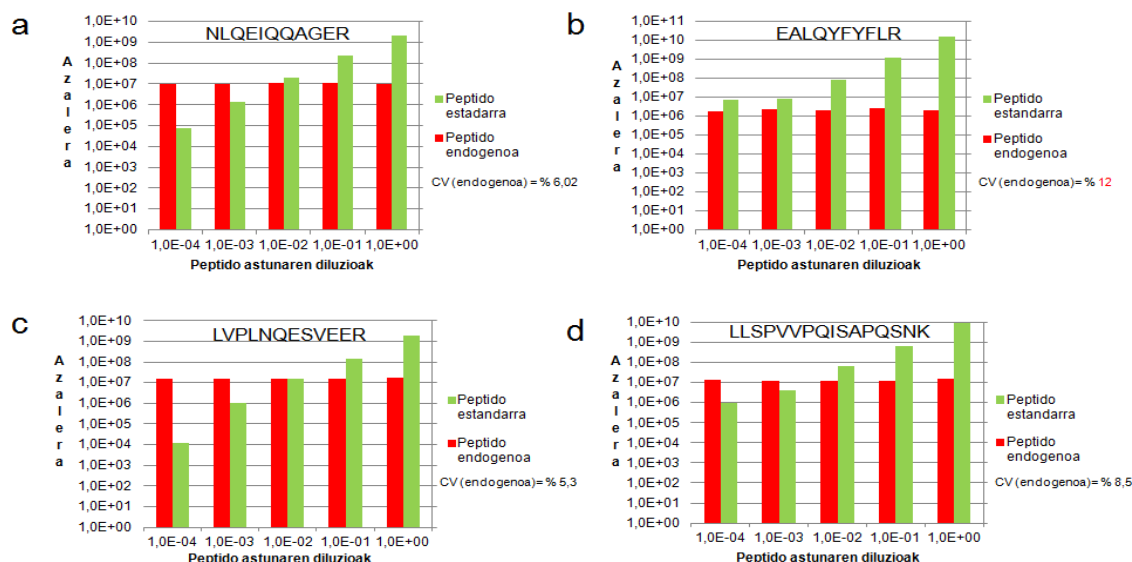


3. irudia. Peptido estandarren kalibraketa-kurbak, eskala logaritmikoak eginak. Irudikatutako seinalea (3 y zatiki intentsuenen pikoen azalera) peptido astunak HEK 293T zelulen lisatuarekin nahastatzerakoan lortu dira.

Peptido endogenoaren analisiari dagokionez, bi ondorio mota atera daitezke: kuantifikagarria den ala ez eta metodoaren errepikakortasuna. Lehenik eta behin, peptido endogenoa kuantifikagarria izateko bere seinalea peptido estandarren tarte dinamikoan egon behar da. Baldintza hori kasu guztietan betetzen da EALQYFYLR peptidoan izan ezik (**4. irudia**), hain zuzen ere linealtasuna lehenago galtzen duelako. Peptido horren azkeneko diluzioan bere seinalea zarata edo interferente baten seinalearekin nahastatu dago eta ondorioz linealtasuna galtzen da. Hortaz, EALQYFYLR endogenoaren seinalea kuantifikatzeko fidagarria den leihotik kanpo dagoenez ezin izango da Nup93 HEK 293T zeluletan kuantifikatzeko erabili, baina beste 3 peptidoak bai. Eraitza hauek proteomika ituratuaren estandarrekin bat datoz, izan ere arrunta izaten da 3 peptido proteotipikoren erabilera jatorrizko proteina monitorizatzeko.

Bigarrenez, peptido endogenoa metodoaren errepikakortasunaren erakuslea ere bada. Horrela, 5 laginetan zelulen lisatu kantitate bera gehitu denez, diluzio ezberdinetan peptido endogeno berdinarekin seinale berdintsua ikusi beharko litzateke. Grafikoki berdintasun hori ikusi arren, dimensio kuantitatiboa eman behar zaio eta horregatik peptido endogeno bakoitzarentzako bere aldakortasun koefizientea (CV) kalkulatu zen (**4. irudia**). EALQYFYFLR peptidoaren kasuan

izan ezik (% 12), beste hiru peptidoen aldakortasun koefizienteak % 10 baino baxuagoak (% 6, % 5 eta % 8) dira. Idealtasun % 10ean finkatuta dagoela jakinda, emaitzak oso onak dira errepikakortasunari dagokionez.



4. irudia: Peptido estandar eta endogenoaren kuantifikazioa. Histograma hauek eraikitzeke berriz ere 3 y zatiki intentsuenen azalerak erabili dira, bai peptido endogenoarentzako (gorriz), bai eta peptido estandararentzako (berdez) ere. Lagin bakoitza izendatzeko dagokion peptido astunen diluzioa aukeratu da, peptido endogeno bakoitzaren kantitatea berdina delako laginen artean. Berdintasun hori kuantifikatzeko eta beraz teknikaren errepikakortasuna zehazteko peptido arin bakoitzari bere aldakortasun koefizientea (CV) kalkulatu zaio.

Laburbilduz, Nup93 totala eta bere 1go isoforma HEK 293T zeluletan fidagarritasunez identifikatzeko eta monitorizatzeko **2. taulan** bildutako peptidoak eta m/z erlazioak proposatzen dira. Hala ere, 2.isoforma monitorizatzea nahiko balitz, ondo purifikatutako eta kuantifikatutako peptidoak erabiliz Nup93 kantitate totalari lehenengo isoformari dagokiona kendu ahalko zen 2. isoformaren kantitatea lortzeko. Beraz, isoformen arteko bereizmena ez da diseinu honen benetako muga.

Proteina	Peptidoa (2+)	Zatikiak (1+)
Nup93-1 (1go isoforma)	NLQEIQQAGER (643,32/648,33)	y8 (930,46/940,47), y7 (801,42/811,42), y6 (688,33/698,34)
Nup 93 (2 isoformak)	LVPLNQESVEER (706,87/711,87)	y10 (1200,58/1210,59), y8 (990,44/1000,45), y5 (619,30/629,31)
	LLSPVVPQISAPQSNK (839,48/843,48)	y10 (1069,56/1077,57), y7 (731,36/739,28), y5 (573,29/581,31)

2. taula. Kuantifikazio erlatiboa egiteko erabili daitezkeen 3 peptidoak eta bere trantsizioak. NLQEIQQAGER peptidoa Nup93 proteinaren lehenengo isoformarekiko espezifikoa denez, honako 3 peptido hauek lehenengo isoforma zein isoforma biak batera monitorizatzeko baliozgarriak izan daitezke. Legenda: Karga kopurua (2+, 1+) eta ioien m/z (arina/astuna).

4. Ondorioak

Proiektu honetan aurkeztutako PRM metodoa gai da HEK 293T zeluletatik eratorritako 1,5 μ g proteinan Nup93-ren peptidoak kuantifikatzeko inolako frakzionamendurik gabe. Gainera, honako analisi hau errepikakortasun maila handiz eta 4 magnitudeko tarte dinamikoa eraikiz egin ahal izan da. Horretarako peptido astunak erabili dira, metodo fidagarria eta normalizatu baimentzen dutenak.

Etorkizunari begira, proiektu honetan aurkeztutako estrategia gehiago garatu daiteke. Alde batetik, proteina honen peptido puruagoak eta zehazki kuantifikatutakoak erabiliz *Limit of quantification* (LOQ) eta *Limit of detection* (LOD) baloreak kalkulatu daitezke. Hauek zehatuko lukete teknikaren sentikortasuna noraino heltzen den proteinaren peptidoak lagin konplexuetan detektatzeko eta kuantifikatzeko. Horretaz gain, Nup93-k biomarkatzaile modura izan dezaken baliozkotasuna ere frogatu daiteke. Horretarako, tumore zeluletan eta ehun berdineko zelula osasuntsuetan Nup93 proteinaren adierazpen berezitua masa espektrometria kuantifikagarria den ala ez aztertu beharko litzateke. Proteina hau tumoreen erakuslea balitz, tratamendu ezberdinen aurrean proteina honen gorabeherak kuantifikatu ahal izango lirarteke tratamendu bakoitzaren baliozkotasuna testatzeko. Bai proteina bat tumoreen erakuslea den finkatzeko, bai eta minbiziaren kontrako tratamenduen baliozkotasuna frogatzeko ere, proteomika diferentzial erlatiboak lagin ugariaren analisi fidagarria ahalbidetzen du.

Bibliografia

Gallien, S., Duriez, E., Crone, C., Kellmann, M., Moehring, T., Domon, B. (2012). Targeted Proteomic Quantification on Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. *Mol. Cell. Proteomic* 11, 1709-1723.

Galy, V., Mattaj, I. W., Askjaer, P. (2003). *Caenorhabditis elegans* Nucleoporins Nup93 and Nup205 Determine the Limit of Nuclear Pore Complex Size Exclusion In Vivo. *Mol. Cell Biol.* 14, 5104–5115.

Hawryluk-Gara, L. A, Shibuya, E. K., Wozniak, R. W. (2005). Vertebrate Nup53 Interacts with the Nuclear Lamina and Is Required for the Assembly of a Nup93-containing Complex. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2382–2394.

Jeady, S., & Schwartz, T. U. (2007). Architecture Reveals a Novel, Intricate Helical Domain Crystal Structure of Nucleoporin Nic96. *J. Biol. Chem.* 282, 34904-34912.

Lange, V., Picotti, P., Domon, B., Aebersold, R. (2008). Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol. Syst Biol.* 4, 222-234.

MacLean, B., Tomazela, D. M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G. L., Frewen, B., Kern R., Tabb, D. L., Liebler, D. C., MacCoss, M. J. (2010). Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 26, 966-968.

Peterson, A. C., Russell, J. D., Bailey, D. J., Westphall, M. S., Coon J. J. (2012). Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Mol. Cell Proteomics*.11, 1475-1488.

Picotti, P., Bodenmiller, B., Aebersold, R. (2013). Proteomics meets the scientific method. *Nat. Meth.* 10, 24-27

Strambio-De-Castillia, C.; Niepel, M.; and Rout, M.P. (2010). The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 490-501.

Tarazón, E., Rivera, M., Roselló-Lletí, E., Molina-Navarro, M. M, Sánchez-Lázaro, I. J., España, F., Montero, J.A, Lago, F., González-Juanatey, J. R., Portolés, M. (2011). Heart Failure Induces Significant Changes in Nuclear Pore Complex of Human cardiomyocytes. *Plos one* 7, 1-10.

Tran, L.M., Zhang, B., Zhang, Z., Zhang, C., Xie, T., Lamb, J.R., Dai, H., Schadt, E., Zhu, J. (2011). Inferring causal genomic alterations in breast cancer using gene expression data. *BMC Syst. Biol.* 5, 121-128.

Wisniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., Mann, M. (2009). Universal simple preparation method for proteome analysis. *Nat. Meth.* 6, 359-363.

Zhao, Z. R., Zhang, L. J., Wang, Y., Li, F., Wang, M. W., Sun, X. F. (2012) Increased serum level of Nup88 protein is associated with the development of colorectal cancer. *Med. Oncol.* 3, 1789-1795.