

METODICKÉ PŘÍSTUPY SOUČASNÉ FOSFOPROTEOMOVÉ ANALÝZY

PETR HALADA

*Mikrobiologický ústav AV ČR Praha, Videňská 1083,
142 20 Praha 4
halada@biomed.cas.cz*

Došlo 2.9.05, přijato 4.11.05.

Klíčová slova: fosforylace, proteomika, hmotnostní spektrometrie, posttranslační modifikace

Obsah

1. Úvod
2. Fosforylace proteinů
3. Metody selektivního zachytu fosfoproteinů a fosfopeptidů
4. Identifikace fosfopeptidů
5. Určení místa fosforylace
6. Kvantitativní fosfoproteomika
7. Závěr

1. Úvod

Genomová éra na konci minulého století odstartovala celou řadu sekvenčních projektů prokaryotických i eukaryotických organismů. V současné době je již přes 160 genomových projektů úspěšně dokončeno a sekvenace více než 600 genomů ještě probíhá¹. Získání velkého počtu genomových sekvencí otevřelo nové možnosti biologického výzkumu a především umožnilo vznik nové vědní disciplíny – proteomiky. Tento mladý, ale rychle se rozvíjející obor, se zabývá detailním popisem veškerého proteomového komplementu genomu (proteomu) určité buňky, tkáně nebo organismu. Protože je proteom vždy studován v daném čase a za určitých podmínek, vystihuje přesně dynamiku zkoumaného systému. Jinými slovy lze říci, že proteom je „dynamický“, a naopak genom je považován za neměnný čili „statický“. Základním cílem proteomiky je objasnění struktury a funkce všech produktů genové exprese daného systému. To zahrnuje identifikaci každého proteinu včetně jeho kvantifikace, lokalizaci proteinu v buňce, určení protein-proteinových interakcí, analýzu multiproteinových komplexů a charakterizaci posttranslačních modifikací (PTM) jako jsou např. glykosylace a fosforylace. Fosforylace se vzhledem ke své úloze v biologických pro-

cesech řadí vůbec k nejdůležitějším a co do počtu k nejčastějším modifikacím proteinů. O jejím významu svědčí vyčlenění speciálního podoboru proteomové analýzy – fosfoproteomiky, která zkoumá veškeré fosfoproteiny v biologickém systému. Cílem této práce je podat ucelený pohled na status quo současné fosfoproteomové analýzy včetně přehledu nejužívanějších metodických postupů a nastínit nejen její možnosti, ale i omezení.

2. Fosforylace proteinů

Aktivita proteinů není určována pouze poměrem jejich biosyntézy a degradace, ale také specifickým procesem posttranslačních modifikací, které ovlivňují molekulární interakce proteinů, jejich funkci, stabilitu a lokalizaci. Fosforylace proteinů je jednou z nejdůležitějších kovalentních PTM v živých organismech. Reverzibilní fosforylace je hlavním regulátorem buněčných procesů jako jsou růst, dělení a diferenciací buňky, přenos signálu, genová exprese a metabolismus. Navázání fosfátové skupiny na molekulu proteinu katalyzují enzymy z rodiny proteinkinasy, zatímco opačnou reakci, defosforylaci, katalyzují proteinfosfatasy. Buňka obsahuje stovky proteinkinasy/proteinfosfatasy, z nichž každá zodpovídá za fosforylaci/defosforylaci určitého proteinu nebo skupiny proteinů. Odhaduje se, že např. lidský genom kóduje přes 2000 kinas a více než 1000 fosfatasy. Stav momentální fosforylace proteinu, a tím i jeho aktivity, závisí na poměru aktivit kinas a fosfatasy, které na něj působí. U eukaryotických organismů se předpokládá, že téměř jedna třetina proteinů je fosforylovaných, a to na serinu (pS), threoninu (pT) nebo tyrosinu (pY) s relativním výskytem v poměru pS ~ 90 %, pT ~ 10 %, pY ~ 0,05 %. U bakterií byla také nalezena dosti vzácná fosforylace na histidinu, glutamové a asparagové kyselině. Pravděpodobnost, jestli bude daná aminokyselina fosforylována, pomůže odhadnout predikční program, který pro eukaryotické proteiny vyhodnocuje sekvenci v okolí aminokyseliny jako potenciální místo rozpoznávané proteinkinasy. Předpověď lze provést buď obecně² (NetPhos 2.0) nebo pro určitou kinasu³ (NetPhosK 1.0).

Obdobně jako proteomika zkoumá veškerý proteomový komplement genomu, zabývá se fosfoproteomika globální analýzou fosforylace proteinů. K jejím hlavním cílům náleží identifikace fosfoproteinů a fosfopeptidů, přesné určení místa fosforylace a kvantifikace fosforylace. Vzhledem ke složitosti problematiky nelze pro splnění těchto cílů použít jedinou univerzální metodu, ale je nutno využít široké spektrum metodických přístupů⁴⁻⁷. Analýza fosfoproteomu tedy není vůbec jednoduchou a rutinní záležitostí, a to i přesto, že separační techniky a metody hmotnostní spektrometrie prošly během poslední dekády roz-

sáhlým vývojem. Obtíže při studiu fosforylace jsou způsobeny zejména následujícími důvody:

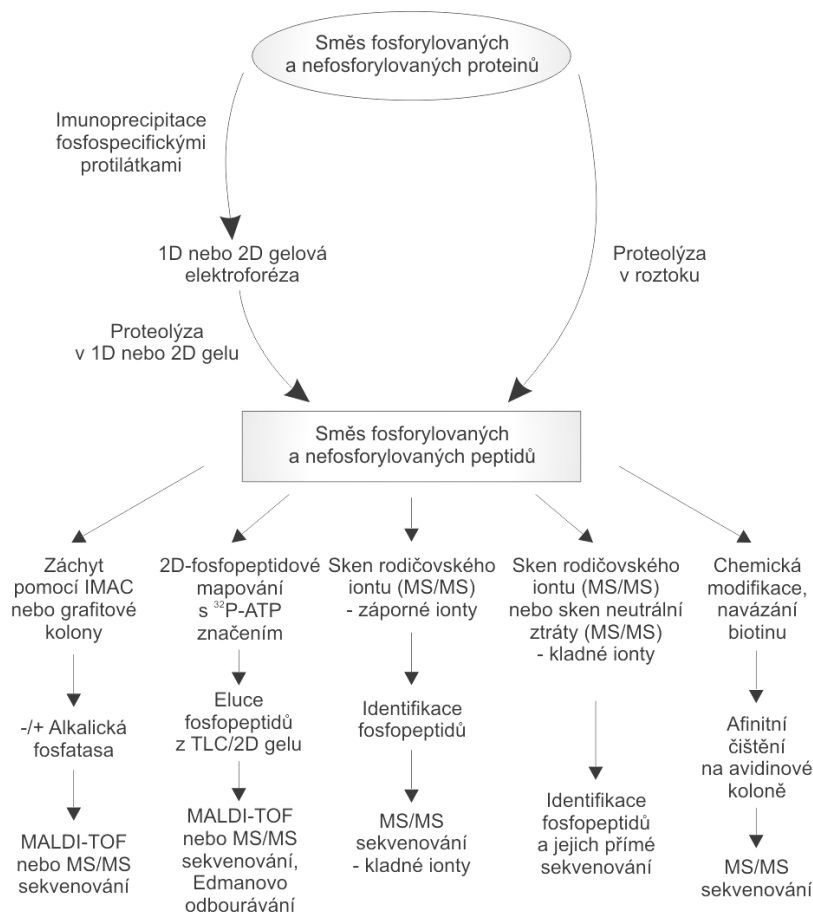
- Rozsah fosforylace je obecně nízký; jen nepatrná část proteinů v buňce je fosforylována v určitém čase.
- Absolutní množství fosfoproteinů v buňce je velmi malé.
- Místa fosforylace stejného proteinu se mohou lišit. Fosfoprotein je heterogenní, tzn. existuje v několika různých fosforylovaných formách.
- Dynamický rozsah používaných analytických metod pro studium fosforylace je omezený. Výsledkem je, že jsou identifikovány pouze majoritní formy fosfoproteinů, zatímco minoritní nejsou vůbec detegovány.
- V důsledku kontaminace fosfátami může během přípravy vzorku docházet k částečnému odštěpení fosfátových skupin.
- Vzhledem ke kyselému a hydrofilnímu charakteru fosfopeptidů je účinnost jejich ionizace při analýzách MS podstatně nižší v porovnání s nemodifikovanými peptidy. Současně může docházet ke ztrátám fosfopeptidů na nosiči používaném na odsolení nebo sepa-

raci peptidové směsi vzniklé po proteolytickém štěpení fosfoproteinů.

V posledních letech byla vyvinuta a optimalizována celá řada metodických přístupů, které se snaží odstranit nebo alespoň zmírnit výše uvedené komplikace při fosfoproteomové analýze. K nim patří především izolace fosfopeptidů/fosfoproteinů pomocí specifických protilátek nebo s využitím afinitní chromatografie, diferenční peptidové mapování po enzymové defosforylaci alkalickou fosfatase, použití aditiv zvyšujících signál fosfopeptidů při analýze MS a využití speciálních skenovacích funkcí hmotnostního spektrometru pro selektivní detekci fosfopeptidů v složitých směsích.

3. Metody selektivního zachytu fosfoproteinů a fosfopeptidů

Jak již bylo uvedeno, pouze nepatrná část proteinů v proteomu je v daném časovém okamžiku fosforylována. Pro úspěšnou charakterizaci fosforylace je proto nezbytné fosfoprotein/fosfopeptid izolovat buď s využitím specifické



Obr. 1. Přehled nejčastěji užívaných metod pro izolaci a identifikaci fosforylovaných proteinů a peptidů

kých protilátek, afinitní chromatografie s imobilizovanými ionty kovů (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC) či metodami s chemickou modifikací fosfátové skupiny (obr. 1).

Nejjednodušší metodou selektivního zachytu fosfoproteinů je imunoprecipitace pomocí fosfospecifických protilátek. Již delší dobu jsou komerčně dostupné protilátky proti pY, které umožňují imunoprecipitaci a následně i izolaci pY proteinů z komplexních směsí⁸. Snahy o selektivní zachyt pY peptidů pomocí těchto protilátek nebyly zatím úspěšné⁹. Pokusy izolovat pS a pT proteiny jsou v současnosti stále ojedinělé¹⁰.

Afinitní chromatografie s imobilizovanými ionty kovů představuje bezesporu nejběžnější techniku pro selektivní zachyt fosfopeptidů^{11,12}. Metodu lze použít pro pS, pT i pY peptidy. Je založena na vysoké afinitě záporně nabitě hydrofilní fosfátové skupiny k iontům kovu, nejčastěji Fe³⁺ a Ga³⁺. Ionty kovu jsou imobilizovány na chelatačním nosiči, kterým bývá iminodiocetová nebo nitrilotriocetová kyselina. Zachycené fosfopeptidy jsou pak z nosiče uvolněny zvýšením pH (přidávkem NH₄OH) nebo fosfátem, což vyžaduje odsolení před analýzou MS. Pro přečištění fosfopeptidů se vzhledem k jejich hydrofilnímu charakteru nedoporučují nosiče na bázi reverzní fáze (Reversed Phase, RP) C18, na kterých dochází k velkým ztrátám. Mnohem vhodnější¹³ je materiál Poros Oligo R3, který byl původně vyvinut pro čištění DNA/RNA. Ještě lepší výsledky byly nedávno dosaženy s mikrokolonkami naplněnými grafitovým práškem¹⁴. Získané fosfopeptidy mohou být měřeny v uspořádání off-line či on-line hmotnostní spektrometrií, případně je analýza MS spojena s defosforylací alkalickou fosfátasou¹³. Limitujícími faktory IMAC může být nižší afinita některých fosfopeptidů k materiálu IMAC, potíže při uvolnění fosfopeptidů s více fosfátovými skupinami a především nespecifický zachyt nefosforylovaných peptidů bohatých na aminokyseliny s karboxylovými skupinami (glutamová a asparagová kyselina). Posledně uvedený nedostatek lze minimalizovat derivatizací všech peptidů esterifikací methanolem, která významně snižuje nespecifickou vazbu karboxylových skupin při IMAC postupu¹⁵. Možnost aplikace IMAC pro izolaci fosfoproteinů zatím nebyla testována.

Pinkse a spol. nedávno prezentovali slibnou techniku¹⁶ pro selektivní zachyt fosfopeptidů na předkolonce naplněné nosičem na bázi oxidu titaničitého (Titansphere). Metoda je založena na dvourozměrné chromatografii spojené přímo s hmotnostním spektrometrem. V prvním rozměru je zapojena kolona s TiO₂ a za ní následuje kolona RP. Fosfopeptidy jsou při kyselém pH selektivně zachyceny na první koloně, zatímco nemodifikované peptidy procházejí až na kolonu RP. Z ní jsou postupně eluovány a vstupují do hmotnostního spektrometru. Teprve poté jsou zvýšením pH z první kolony vymyty fosfopeptidy, které jsou po zkoncentrování na koloně RP nastříkány k analýze MS. Tato metoda je v porovnání s technikou IMAC méně pracná a mohla by nalézt uplatnění při analýzách složitých směsí.

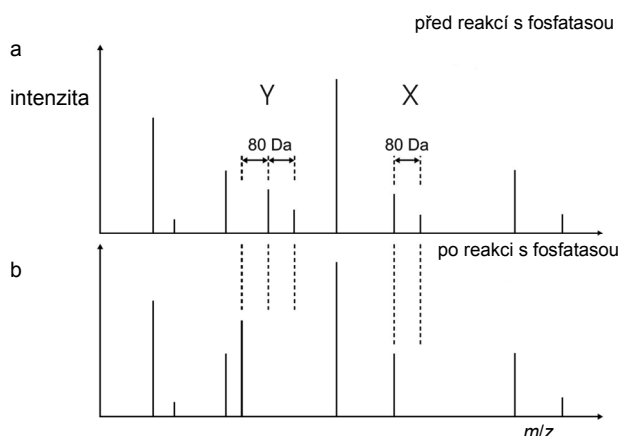
Jiný metodický přístup pro zachyt fosfoproteinů/

fosfopeptidů založený na chemické derivatizaci fosfátové skupiny byl publikován současně dvěma pracovišti. Oda a spol.¹⁷ nejprve vystaví směs peptidů či proteinů vysokému pH, při kterém se β-eliminací odštěpuje H₃PO₄ za vzniku reaktivní dvojné vazby. Ta následně reaguje s nukleofilním činidlem, ethan-1,2-dithiolem, na jehož volnou thiolovou skupinu se naváže biotin. Takto označené peptidy/proteiny lze pak jednoduše izolovat afinitním čištěním na avidinové koloně. Popsaný postup je použitelný jen pro pS a pT peptidy/proteiny a vyžaduje modifikaci reaktivních cysteinových zbytků oxidací kyselinou permravenčí. Současně se ovšem oxiduje methionin na sulfon a tryptofan na dvě formy s dvěma a třemi kyslíkovými atomy. Případná O-glykosylace, která také snadno podléhá β-eliminaci, způsobuje další komplikace. U druhé strategie¹⁸ jsou proteiny po alkylation cysteinů nejprve štěpeny specifickou proteasou. Karboxylové skupiny vzniklých peptidů jsou derivatizovány amidací a aminoskupiny chráněny *tert*-butoxykarbonylovou skupinou. Takto ochráněné fosfopeptidy jsou modifikovány kondenzací s cystaminem, kovalentně zachyceny na pevném nosiči s imobilizovanou jodoctovou kyselinou, následně promyty a uvolněny trifluoroctovou kyselinou. Metoda byla použita pro pS, pT a také pro pY peptidy, nebyla však zatím vyzkoušena přímo na intaktních proteinech. Oba postupy se skládají z celé řady chemických reakcí a čistících kroků, z nichž každý představuje nezanedbatelné ztráty. Dostatečné množství materiálu je tedy obecným požadavkem přístupu založeného na chemické derivatizaci, což zatím umožňuje pouze zachyt hojně se vyskytujícími fosfopeptidů/fosfoproteinů. Nespornou výhodou těchto metod je nahrazení záporně nabitého fosfátu neutrální funkční skupinou. Nově modifikovaný peptid se v porovnání s původním fosfopeptidem mnohem lépe ionizuje a také ochotněji fragmentuje. Přitom je nová funkční skupina dostatečně stabilní a při fragmentaci nedochází k jejímu přednostnímu odštěpení, což umožní snadno určit místo fosforylace (viz kapitoly 4, 5).

4. Identifikace fosfopeptidů

Prvním z úkolů fosfoproteomiky je identifikace fosfopeptidů neboli jejich odlišení od ostatních přítomných peptidů. Tradiční metody (obr. 1) zahrnují enzymové označení proteinu radioaktivním ATP následované proteolytickým štěpením. Vzniklá směs peptidů je pak rozdělena metodami HPLC, TLC (cit.^{19,20}) nebo dvourozměrnou gelovou elektroforézou²¹ (2DE) a fosfopeptidy jsou detegovány díky své radioaktivitě buď jako frakce HPLC, skvrna na gelu či na desce TLC. Tento postup fosfopeptidového mapování je dosti pracný a zdlouhavý, navíc vyžaduje práci s neoblíbenou radioaktivitou.

V poslední době zaujímají ve fosfoproteomové analýze výhradní místo metody založené na hmotnostní spektrometrii. MS poskytuje informaci o molekulové hmotnosti (Molecular Weight, MW), tedy o vlastnosti, která je charakteristická pro každé chemické individuum. Uvážíme-li, že každá PTM proteinu mění jeho hmotnost, je MS určité



Obr. 2. **Diferenční fosfopeptidové mapování;** srovnání hmotnostních spekter MALDI-TOF trypsinového digestu před (a) a po (b) reakci s alkalickou fosfatasou umožní jednoznačnou detekci fosfopeptidů. Píky fosfopeptidů po reakci zcela zmizí. Hmotnostní rozdíl (Δm , násobek 80 Da odpovídá jednomu fosfátu) mezi signály fosfopeptidu a jeho defosforylovaného analogu určí počet navázaných fosfátových skupin. Peptid X tedy obsahuje jeden fosfát ($\Delta m = 1 \times 80$ Da), zatímco v sekvenci peptidu Y jsou navázány dvě fosfátové skupiny ($\Delta m = 2 \times 80$ Da)

ideálním nástrojem k analýze PTM. Každá fosfátová skupina navázaná na serin, threonin či tyrosin vede ke zvýšení molekulové hmotnosti o 80 hmotnostních jednotek, tzv. Daltonů (Da). Změření MW intaktního fosfoproteinu v kombinaci se znalostí MW nemodifikovaného proteinu či defosforylací fosfatasou umožní určení průměrného počtu fosfátů navázaných na polypeptidový řetězec. Takto získáme pouze hrubý odhad, pro získání přesnější informace je nutné podrobit protein proteolýze a pracovat s jeho fragmenty – peptidy. Pokud je sekvence proteinu známá, interpretace hmotnostního spektra peptidů – peptidové mapy, odhalí fosfopeptidové kandidáty jako píky s MW vyšší o násobky 80 Da než by příslušelo nemodifikovanému peptidu. Mnohem průkaznější je porovnání peptidových map před a po reakci s alkalickou fosfatasou²² (obr. 2). Pokud najdeme ve spektrech odpovídající píky fosfopeptidu a jeho defosforylovaného analogu, odečteme navíc z rozdílu jejich MW počet fosfátů navázaných na původním fosforylovaném peptidu. Pokud najdeme v peptidové mapě po defosforylaci pouze nový signál, určíme peptid, který byl modifikován, ale ne počet fosfátů v jeho sekvenci. Nepřítomnost signálu fosfopeptidu ve spektru je typická pro větší (MW > 2500 Da) a vícenásobně fosforylované peptidy. S cílem získat co nejvíce informací z jednoho vzorku a snížit požadované množství proteinu lze defosforylací provést přímo na terčiku MALDI po předchozím změření peptidové mapy¹³. Pro identifikaci pS a pT peptidů lze rovněž využít β -eliminace s následnou derivatizací původních fosfopeptidů směsí dvou alkanthiolů (např. C3 a C7)²³. Tyto modifikované peptidy lze pak ve spektrech snadno rozpoznat díky charakteristické dvojici píků lišících se o 56 Da.

Vysoce specifickou metodu detekce fosfopeptidů představuje využití speciálních skenovacích funkcí tandemových hmotnostních spektrometrů jako je sken neutrálních ztrát a sken rodičovského iontu. Nicméně již běžná analýza MALDI-TOF může někdy odhalit fosfopeptidy díky jejich charakteristické fragmentaci²⁴. Při měření v režimu kladných iontů vykazují pS a pT peptidy významnou ztrátu neutrální molekuly H_3PO_4 za vzniku čtvernoho iontu $[MH-98]^+$. Ten je doprovázen minoritním iontem $[MH-80]^+$, který odpovídá ztrátě HPO_3 . Naopak ve spektrech pY peptidů dominuje píka iontu $[MH-80]^+$, což umožňuje jejich odlišení od pS a pT peptidů. Rozdílná fragmentace je vysvětlována vyšší stabilitou aromatického kruhu fosfotyrosinu.

Typická ztráta molekuly H_3PO_4 se nabízí pro detekci pS a pT peptidů ve složitých směsích s využitím skenu neutrálních ztrát. Za podmínek kolizně indukované disociace (Collisionally Induced Dissociation, CID) dochází k β -eliminaci H_3PO_4 z pS a pT za vzniku dehydroalaninu a dehydroamino-2-máselné kyseliny. Tento experiment lze provést jen u tandemových hmotnostních spektrometrů (MS/MS) jako je trojnásobný kvadrupól (Triple Stage Quadrupole, TSQ)²⁵, kvadrupól v kombinaci s analyzátozem z doby letu (Time Of Flight, Q-TOF), případně iontová past (Ion Trap, IT). Spektrometr je nastaven tak, že hledá kolizní spektra, která vykazují ztrátu 98, 49 a 32,3 Da odpovídající eliminaci H_3PO_4 z jednou, dvakrát a třikrát nabitých rodičovských iontů fosfopeptidů. Současně je z iontu vznikajícího neutrální ztrátou H_3PO_4 získáno spektrum MS/MS poskytující informaci o lokalizaci fosforylace. Původní pS a pT je pak v sekvenci peptidu identifikován jako dehydroalanin (69 Da) a dehydroamino-2-máselná kyselina (83 Da).

Za podmínek CID při analýze MS v režimu záporných iontů poskytují pS, pT i pY peptidy v alkalickém prostředí diagnostický ion PO_3^- (79 Da), který dovoluje jejich vysoce specifickou detekci pomocí skenu rodičovského iontu^{26,27}. Při experimentu se zaznamenávají jen spektra rodičovských iontů (prekurzorů) poskytujících charakteristický ion 79 Da. Tato spektra obsahují pouze molekulární ion prekurzoru (fosfopeptidu). Pokud známe sekvenci proteinu, je tato informace dostačující pro přiřazení peptidu, který je fosforylován. Případné sekvenování pro detailní určení místa fosforylace vyžaduje změnu polarity spektrometru do režimu kladných iontů a rovněž snížení pH, což brání využití této metody při uspořádání LC-MS/MS.

Pro selektivní detekci pY peptidů byla vyvinuta metoda²⁸ založená na tvorbě imoniového iontu fosfotyrosinu s m/z 216,043. Technika vyžaduje hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením (Q-TOF) dovolující jednoznačně odlišit diagnostický fosfotyrosinový ion od ostatních interferujících peptidových fragmentů se stejnou hodnotou m/z . Měření se provádí v režimu kladných iontů, což usnadňuje sekvenování pY peptidu. Vzhledem k nestabilnímu chování pS a pT za podmínek CID nelze metodu použít pro detekci pS a pT peptidů.

Jiná technika umožňující identifikaci pS, pT i pY

peptidů kombinuje β -eliminaci fosfátu, chemickou derivatizací a sken rodičovského iontu²⁹. β -Eliminací v alkalickém prostředí vzniká reaktivní dvojná vazba, na kterou se aduje 2-(dimethylamino)ethan-1-thiol. Vytvořený thioether se oxiduje peroxidem vodíku na odpovídající sulfoxid, který se při CID snadno štěpí za vzniku derivátu sulfenové kyseliny s m/z 122. Tento ion díky své jedinečné hodnotě m/z jednoznačně odlišuje fosfopeptidy od ostatních peptidů. Techniku lze provádět i na spektrometru s nízkým rozlišením a rovněž v uspořádání LC-MS/MS.

Pro specifickou detekci fosfopeptidů jsou k dispozici také dvě méně známé techniky. První monitoruje přítomnost izotopu ^{31}P během HPLC separace digestu fosfoproteinu metodou MS s indukčně vázaným plazmatem (Inductively Coupled Plasma, ICP)³⁰. Pro odlišení izobarických iontů s ^{31}P je nutno mít spektrometr s dostatečným rozlišením (většinou sektorový přístroj). Molekulová hmotnost fosfopeptidů je poté určena v samostatné analýze LC-MS s ionizací elektrospřejem (Electrospray Ionization, ESI). Měření poměru ^{31}P a ^{32}S metodou ICP-MS lze využít pro stanovení průměrného zastoupení fosfátu v molekule proteinu³¹. Druhá technika vychází ze skutečnosti, že fosforylace způsobuje změnu konformace peptidových iontů v plynné fázi^{32,33}. Tato změna je detegována hmotnostním spektrometrem měřícím mobilitu iontů.

Kromě již popsaných technik existuje několik „triků“, většinou ve spojení s ionizací MALDI, jak snadno odhalit fosfopeptidy. Prvním je změření proteinového digestu v režimu záporných iontů na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF. Fosfopeptidy mají obecně velmi nízkou ionizační účinnost v režimu kladných iontů, zatímco v režimu záporných iontů dávají velmi intenzivní odezvy v porovnání se svými nefosforylovanými analogy³⁴. To se projeví mnohem více, když se peptidy před analýzou MALDI esterifikují methanolem³⁵. Jednoduché srovnání spekter měřených v režimu kladných a záporných iontů pomůže najít signály, které by mohly patřit fosfopeptidům.

Důležitým aspektem je rovněž volba matrice MALDI. Nejběžnějšími maticemi pro analýzu peptidů jsou 4-hydroxy- α -kyanskořicová a 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB). Pro fosfopeptidy je vzhledem k jejich hydrofilnímu charakteru mnohem vhodnější DHB. Jako vhodná matrice je rovněž doporučován 2',4',6'-trihydroxyacetofenon s přísadkou citrátu amonného³⁶. Přídavek aditiv jako jsou amonné soli³⁷ či kyselina fosforečná³⁸ k matici MALDI je další možností, jak zvýraznit signál fosforylovaných peptidů. Navíc bylo zjištěno, že směs DHB a kyseliny fosforečné je výborným elučním činidlem při technice IMAC³⁹.

5. Určení místa fosforylace

Detekce fosfopeptidů je jen prvním krokem fosfoproteinové analýzy. Dalším logickým požadavkem je určení místa fosforylace. K tomu slouží dnes již výhradně tande-

mová hmotnostní spektrometrie (obr. 1), která zcela vytlačila tradiční Edmanovo odbourávání. Pokud je známa sekvence peptidu a ta obsahuje jen jeden serin, threonin či tyrosin, je přiřazení místa fosforylace snadné a vystačíme pouze se znalostí MW peptidu. Většina případů ovšem není tak triviálních (peptid obsahuje více hydroxyamino-kyselin) a vyžaduje fragmentaci peptidu metodami MS/MS. Experimenty MS/MS se nejčastěji provádějí na IT (cit.^{40,41}), TSQ (cit.^{27,42}) a Q-TOF (cit.⁴³) spektrometrech. Vzhledem k nestabilnímu chování fosfátové skupiny je hlavním procesem za podmínek CID ztráta fosfátu ve formě H_3PO_4 nebo HPO_3 . Stabilita klesá v pořadí $\text{pY} > \text{pT} > \text{pS}$. Fosfát se proto nejsnáze uvolňuje z pS, nejméně ochotně z pY. Pro pS a pT je charakteristická ztráta H_3PO_4 , u pY dominuje uvolnění HPO_3 . Ochota uvolnit fosfátovou skupinu souvisí s nábojovým stavem peptidu a je největší pro jednu nabitě ionty. U vícenásobně nabitých peptidů je k dispozici mobilní proton, který vyvolá fragmentaci peptidového řetězce za vzniku sekvenčních b- a y-iontů⁴⁴ umožňující určení místa navázání fosfátu. Někdy ovšem ztráta fosfátu převažuje a k fragmentaci peptidového řetězce téměř nedochází, což komplikuje lokalizaci místa modifikace. Komplikaci rovněž způsobují ztráty fosfátu a vody z b- a y-iontů, kdy navíc dostáváme fragmentové ionty b-98, y-98, b-18, y-18, případně b-80 a y-80. To platí především pro pS, méně již pro pT. Řešením může být nahrazení labilního fosfátu stabilní funkční skupinou. Fosfát se odstraní β -eliminací hydroxidem a protein se nechá reagovat buď s ethanthiolem⁴⁵ nebo siričitanem sodným⁴⁶. V prvním případě je pS/pT převeden na S-ethylcystein nebo β -methyl-S-ethylcystein, ve druhém na cysteovou nebo β -methylcysteovou kyselinu. Takto modifikované peptidy fragmentují podél celého peptidového řetězce a poskytují úplnější sekvenční informaci dovolující snažší určení místa fosforylace.

Skvělou metodou pro lokalizaci fosforylace je disociace záchytem elektronu (Electron Capture Dissociation, ECD) ve spojení s hmotnostní spektrometrií s iontovou cyklotronovou resonancí s Fourierovou transformací (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, FTICR). ECD vyvolává rozsáhlejší a rovnoměrnější fragmentaci peptidu než CID a tím dosahuje vyššího pokrytí sekvence. Při ECD dále nedochází ke ztrátám H_3PO_4 , HPO_3 ani H_2O , což dovoluje přímou identifikaci fosforylačních míst⁴⁷. Díky extrémně vysokému rozlišení spektrometrů FTICR mohou být touto technikou studovány také velké peptidy i celé proteiny⁴⁸.

Jiná technika pro lokalizaci fosforylace využívá β -eliminace v kombinaci s adicí s 2-aminoethan-1-thiolem^{49,50}. Před touto reakcí jsou všechny lysiny ochráněny a až poté jsou pS a pT selektivně přeměněny na analogy lysinu, S-(2-aminoethyl)cystein a β -methyl-S-(2-aminoethyl)cystein. Modifikované peptidy jsou štěpeny Lys-C proteasou a následná analýza MS pak jednoduše určí místa fosforylace. Nevýhodou je, že stejnou reakci podstupují také O-glykosylovaný serin a threonin.

6. Kvantitativní fosfoproteomika

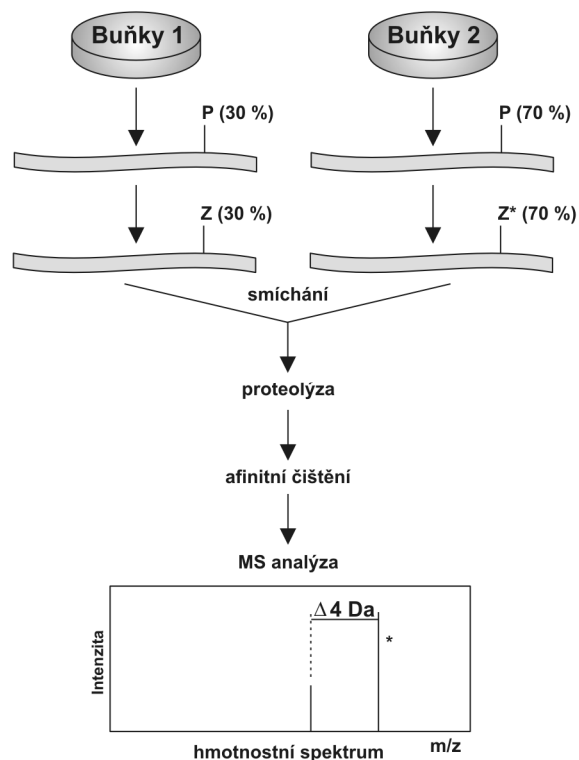
S ohledem na dynamické chování biologických systémů není identifikace fosfopeptidu a určení místa fosforylace dostačující informací pro pochopení úlohy daného fosfoproteinu v organismu. Dále by nás mělo zajímat, jak se fosforylace určitého místa mění v čase a jaký je stupeň této fosforylace v daném časovém okamžiku. Odpovědět na tyto otázky je schopna kvantitativní fosfoproteomika, u které je nutno ještě rozlišovat mezi určením relativní a absolutní stechiometrie fosforylace. Relativní kvantifikace sleduje změnu fosforylace určitého místa mezi dvěma buněčnými stavy, zatímco ve druhém případě se měří absolutní stechiometrie daného fosforylačního místa neboli stupeň fosforylace, tj. poměr fosforylované a nefosforylované formy, případně celkové množství fosfopeptidu, počtem fosfoproteinu ve vzorku.

Techniky relativní kvantifikace jsou založeny na izotopovém značení proteinů buď *in vivo* během růstu buněk nebo *in vitro* chemickou derivatizací, která navíc umožňuje selektivní zachyt a detekci původního fosfopeptidu. Při *in vivo* značení roste jedna kultura na běžném kultivačním médiu, zatímco při druhé kultivaci stejné médium obsahuje výhradně izotop ^{15}N . Po určité době jsou obě kultivace spojeny, vybrané proteiny jsou separovány, podrobeny proteolytickému štěpení a analýze MS. Protože během růstu buněk byly inkorporovány oba izotopy dusíku (^{14}N a ^{15}N), naměříme pro každý proteolytický fragment dvojici piků. Poměr intenzit fosfopeptidu s ^{14}N a jeho nemodifikovaného analogu značeného ^{15}N pak odpovídá změně hladiny fosforylace určitého místa daného proteinu⁵¹. Provedení této techniky je velmi jednoduché, nedovoluje ale žádné selektivní zachycení fosfoproteinu/fosfopeptidu. Alternativou *in vivo* značení je tzv. metoda SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture), která pro vnesení těžkého izotopu využívá značených aminokyselin^{52,53}. Strategie SILAC v kombinaci s izolací peptidů metodou IMAC byla nedávno úspěšně aplikována při kvantitativní analýze kvasinkového fosfoproteomu⁵⁴.

In vitro značení vychází z metody izotopicky kódovaných afinitních značek (Isotope Coded Affinity Tag, ICAT) uplatňovaných v klasické kvantitativní proteomice⁵⁵. Rozšíření tohoto postupu pro kvantifikaci fosforylace (pouze pro pS a pT) se nazývá PhIAT (Phosphoprotein Isotope Coded Affinity Tag) a je uvedeno na obr. 3. Strategie PhIAT zahrnuje hydroxidem vyvolanou β -eliminaci fosfátu následovanou adicí ethan-1,2-dithiolu (EDT), který obsahuje buď čtyři vodíkové atomy nebo čtyři deuteria^{56,57}. Po spojení obou vzorků se na volnou skupinu SH druhého thiolu naváže biotin, který umožní selektivní izolaci původních fosfopeptidů afinitní chromatografií. Získaná směs je analyzována na spektrometru LC-MS/MS, který určí sekvenci peptidu a místo fosforylace. Relativní změna fosforylace jednotlivých fosfopeptidů se odečte z poměru intenzit piků nativního a deuterovaného peptidu, které jsou ve spektrech snadno odhaleny díky jejich hmotnostnímu rozdílu 4 Da (D_0/D_4). Technika PhIAT byla po svém zavedení autory nepatrně modifikována⁵⁸. Peptidy s EDT jsou

v jednom stupni zachyceny a izotopově označeny na pevném nosiči obsahujícím buď lehké nebo těžké izotopy. Navázané peptidy jsou z nosiče uvolněny fotochemicky UV zářením a analyzovány LC-MS/MS. Jsou popsány také postupy nahrazující EDT jinými chemickými značkami^{59,60}.

Zatímco techniky relativní kvantifikace byly aplikovány i pro reálné vzorky, je absolutní stechiometrie fosforylace poněkud méně prozkoumanou oblastí, pro kterou bylo vyvinuto jen několik metodických přístupů. U prvního je nejprve vzorek rozdělen a obě poloviny jsou diferencně izotopově označeny. Jedna z frakcí je defosforylována alkalickou fosfatásou, obě frakce jsou spojeny zpět a analyzovány MS. Stupeň fosforylace je odvozen ze srovnání intenzit signálů dvou diferencně značených nefosforylovaných peptidů, přičemž se předpokládá, že nárůst



Obr. 3. Kvantifikace relativní stechiometrie fosforylace metodou PhIAT využívající izotopově kódovaných afinitních značek; změna fosforylace je určována pro dva rozdílné buněčné stavy (Buňky 1 a Buňky 2). Hladina fosforylace jednoho určitého fosforylačního místa je 30 % pro Buňky 1 a 70 % pro Buňky 2. Fosfát je nejprve nahrazen chemickou derivatizací afinitní značkou Z, která je u Buněk 2 izotopově označena čtyřmi atomy deuteria odpovídající hmotnostnímu rozdílu 4 Da (Z^*). Po smíchání obou kultur jsou proteiny štěpeny specifickou proteasou. Původně fosforylované peptidy jsou pak pomocí značky přečištěny a analyzovány hmotnostní spektrometrií. Relativní změna fosforylace se odečte z poměru intenzit piků nativního a deuterovaného peptidu (s hvězdičkou), které jsou ve spektrech snadno rozpoznány díky jejich hmotnostnímu rozdílu 4 Da

jeho intenzity odpovídá defosforylaci původního fosfopeptidu^{61,62}. Druhá metoda nazvaná AQUA (Absolute QUAntification) je založena na izotopovém zředování⁶³. Nejdříve je vybrán vhodný fosfopeptid, který bude sloužit pro kvantifikaci. Tento peptid je syntetizován s izotopově značenou aminokyselinou a použit jako interní standard, který je ve známém množství přidán ke vzorku. Absolutní kvantifikace je pak provedena na základě srovnání intenzit dvou odpovídajících píků fosforylovaného peptidu (izotopově značeného a nativního). V současné době byla prezentována zcela nová technika nevyžadující pracné a nákladné izotopické značení⁶⁴. Metoda je založena na měření normalizovaného iontového proudu a umožňuje relativní i absolutní stanovení stechiometrie fosforylace.

7. Závěr

Přestože byla v posledních letech vyvinuta a rozpracována celá řada metodických přístupů pro izolaci, detekci, identifikaci a kvantifikaci fosfoproteinů, není charakterizace fosforylace minoritních proteinů nebo fosfoproteinů v komplexních směsích vůbec rutinní záležitostí. Navíc ve fosfoproteomice neexistuje jedna univerzální technika, a proto je nutno ze širokého spektra dostupných metod vybrat pro analýzu každého fosfoproteinu tu správnou individuální strategii. Klíčovými parametry ovlivňujícími volbu vhodné metody jsou množství proteinu, typ aminokyseliny, která je fosforylována, zda je k dispozici čistý fosfoprotein nebo komplexní směs proteinů a v neposlední řadě druh informace, který chceme získat. Jestliže pro identifikaci proteinu metodou peptidového mapování vystačíme s několika femtomoly, pro charakterizaci fosforylace, a PTM obecně, je nutno mít k dispozici množství proteinu minimálně řádu pikomolů. Pravděpodobnost úspěchu analýzy bude vždy vyšší, použijeme-li jakoukoliv techniku selektivního záchytu fosfoproteinu/fosfopeptidu. V nejbližší době lze očekávat, že se vzrůstajícím počtem známých proteinových sekvencí bude pro izolaci fosfoproteinů stále více využíváno fosfospecifických protilátek, především proti fosfoserinu a fosfothreoninu. Techniky selektivního záchytu fosfoproteinů/fosfopeptidů založené na chemické modifikaci a metodě IMAC budou optimalizovány se snahou o jejich on-line napojení na hmotnostní spektrometr pomocí čipové technologie. Díky schopnosti dosáhnout při peptidovém mapování až 100% pokrytí sekvence proteinu lze rovněž předpokládat častější využívání prozatím unikátní instrumentace FTICR. V kombinaci s technikou ECD je možné navíc získat informačně bohatší spektrum MS/MS než při experimentu CID a tak jednoznačně určit místo fosforylace. Kromě studia jednotlivých fosfoproteinů budou nové trendy fosfoproteomové analýzy směřovány na „globální“ charakterizaci fosforylace souboru proteinů celých organel nebo buněk.

Sepsání této publikace bylo podporováno grantovým projektem GAČR (204/04/0571) a výzkumným záměrem AV0Z50200510.

LITERATURA

1. http://ergo.integratedgenomics.com/ERGO_supplement/genomes.html, staženo 31.3.2005.
2. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>, staženo 31.3.2005.
3. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>, staženo 31.3.2005.
4. Mann M., Ong S. E., Gronborg M., Steen H., Jensen O. N., Pandey A.: *Trends Biotechnol.* 20, 261 (2002).
5. Kalume D. E., Molina H., Pandey A.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 64 (2003).
6. McLachlin D. T., Chait B. T.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 591 (2001).
7. Salih E.: *Mass Spectrom. Rev.* (2004).
8. Pandey A., Podtelejnikov A. V., Blagoev B., Bustelo X. R., Mann M., Lodish H. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 179 (2000).
9. Marcus K., Immler D., Sternberger J., Meyer H. E.: *Electrophoresis* 21, 2622 (2000).
10. Gronborg M., Kristiansen T. Z., Stensballe A., Andersen J. S., Ohara O., Mann M., Jensen O. N., Pandey A.: *Mol. Cell. Proteomics* 1, 517 (2002).
11. Posewitz M. C., Tempst P.: *Anal. Chem.* 71, 2883 (1999).
12. Stensballe A., Andersen S., Jensen O. N.: *Proteomics* 1, 207 (2001).
13. Larsen M. R., Sorensen G. L., Fey S. J., Larsen P. M., Roepstorff P.: *Proteomics* 1, 223 (2001).
14. Larsen M. R., Graham M. E., Robinson P. J., Roepstorff P.: *Mol. Cell. Proteomics* 3, 456 (2004).
15. Ficarro S. B., McClelland M. L., Stukenberg P. T., Burke D. J., Ross M. M., Shabanowitz J., Hunt D. F., White F. M.: *Nat. Biotechnol.* 20, 301 (2002).
16. Pinkse M. W., Uitto P. M., Hilhorst M. J., Ooms B., Heck A. J.: *Anal. Chem.* 76, 3935 (2004).
17. Oda Y., Nagasu T., Chait B. T.: *Nat. Biotechnol.* 19, 379 (2001).
18. Zhou H., Watts J. D., Aebersold R.: *Nat. Biotechnol.* 19, 375 (2001).
19. Nagahara H., Latek R. R., Ezhevsky S. A., Dowdy S. F.: *Methods Mol. Biol.* 112, 271 (1999).
20. Affolter M., Watts J. D., Krebs D. L., Aebersold R.: *Anal. Biochem.* 223, 74 (1994).
21. Gatti A., Traugh J. A.: *Anal. Biochem.* 266, 198 (1999).
22. Zhang X., Herring C. J., Romano P. R., Szczepanowska J., Brzeska H., Hinnebusch A. G., Qin J.: *Anal. Chem.* 70, 2050 (1998).
23. Molloy M. P., Andrews P. C.: *Anal. Chem.* 73, 5387 (2001).
24. Annan R. S., Carr S. A.: *Anal. Chem.* 68, 3413 (1996).
25. Schlosser A., Pipkorn R., Bossemeyer D., Lehmann W. D.: *Anal. Chem.* 73, 170 (2001).
26. Carr S. A., Huddleston M. J., Annan R. S.: *Anal. Biochem.* 239, 180 (1996).
27. Annan R. S., Huddleston M. J., Verma R., Deshaies

- R. J., Carr S. A.: *Anal. Chem.* 73, 393 (2001).
28. Steen H., Kuster B., Fernandez M., Pandey A., Mann M.: *Anal. Chem.* 73, 1440 (2001).
 29. Steen H., Mann M.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, 996 (2002).
 30. Wind M., Edler M., Jakubowski N., Linscheid M., Wesch H., Lehmann W. D.: *Anal. Chem.* 73, 29 (2001).
 31. Wind M., Wesch H., Lehmann W. D.: *Anal. Chem.* 73, 3006 (2001).
 32. Ruotolo B. T., Verbeck G. F. t., Thomson L. M., Woods A. S., Gillig K. J., Russell D. H.: *J. Proteome Res.* 1, 303 (2002).
 33. Ruotolo B. T., Gillig K. J., Woods A. S., Egan T. F., Ugarov M. V., Schultz J. A., Russell D. H.: *Anal. Chem.* 76, 6727 (2004).
 34. Janek K., Wenschuh H., Bienert M., Krause E.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, 1593 (2001).
 35. Xu C. F., Lu Y., Ma J., Mohammadi M., Neubert T. A.: *Mol. Cell. Proteomics* (2005).
 36. Yang X., Wu H., Kobayashi T., Solaro R. J., van Breemen R. B.: *Anal. Chem.* 76, 1532 (2004).
 37. Asara J. M., Allison J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 35 (1999).
 38. Kjellstrom S., Jensen O. N.: *Anal. Chem.* 76, 5109 (2004).
 39. Stensballe A., Jensen O. N.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 1721 (2004).
 40. DeGnove J. P., Qin J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9, 1175 (1998).
 41. Moyer S. C., Cotter R. J., Woods A. S.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, 274 (2002).
 42. Neubauer G., Mann M.: *Anal. Chem.* 71, 235 (1999).
 43. Bennett K. L., Stensballe A., Podtelejnikov A. V., Moniatte M., Jensen O. N.: *J. Mass Spectrom.* 37, 179 (2002).
 44. Roepstorff P., Fohlman J.: *Biomed. Mass Spectrom.* 11, 601 (1984).
 45. Jaffé H., Veeranna, Pant H. C.: *Biochemistry* 37, 16211 (1998).
 46. Li W., Boykins R. A., Backlund P. S., Wang G., Chen H. C.: *Anal. Chem.* 74, 5701 (2002).
 47. Stensballe A., Jensen O. N., Olsen J. V., Haselmann K. F., Zubarev R. A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 1793 (2000).
 48. Sze S. K., Ge Y., Oh H., McLafferty F. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 1774 (2002).
 49. Rusnak F., Zhou J., Hathaway G. M.: *J. Biomol. Tech.* 13, 228 (2002).
 50. Knight Z. A., Schilling B., Row R. H., Kenski D. M., Gibson B. W., Shokat K. M.: *Nat. Biotechnol.* 21, 1047 (2003).
 51. Oda Y., Huang K., Cross F. R., Cowburn D., Chait B. T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6591 (1999).
 52. Ong S. E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D. B., Steen H., Pandey A., Mann M.: *Mol. Cell. Proteomics* 1, 376 (2002).
 53. Ibarrola N., Kalume D. E., Gronborg M., Iwahori A., Pandey A.: *Anal. Chem.* 75, 6043 (2003).
 54. Gruhler A., Olsen J. V., Mohammed S., Mortensen P., Faergeman N. J., Mann M., Jensen O. N.: *Mol. Cell. Proteomics* 4, 310 (2005).
 55. Gygi S. P., Rist B., Gerber S. A., Tureček F., Gelb M. H., Aebersold R.: *Nat. Biotechnol.* 17, 994 (1999).
 56. Goshe M. B., Conrads T. P., Panisko E. A., Angell N. H., Veenstra T. D., Smith R. D.: *Anal. Chem.* 73, 2578 (2001).
 57. Goshe M. B., Veenstra T. D., Panisko E. A., Conrads T. P., Angell N. H., Smith R. D.: *Anal. Chem.* 74, 607 (2002).
 58. Qian W. J., Goshe M. B., Camp D. G., 2nd, Yu L. R., Tang K., Smith R. D.: *Anal. Chem.* 75, 5441 (2003).
 59. Adamczyk M., Gebler J. C., Wu J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 999 (2002).
 60. Weckwerth W., Willmitzer L., Fiehn O.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 1677 (2000).
 61. Hegeman A. D., Harms A. C., Sussman M. R., Bunner A. E., Harper J. F.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15, 647 (2004).
 62. Zhang X., Jin Q. K., Carr S. A., Annan R. S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 2325 (2002).
 63. Gerber S. A., Rush J., Stemman O., Kirschner M. W., Gygi S. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6940 (2003).
 64. Steen H., Jebanathirajah J. A., Springer M., Kirschner M. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 3948 (2005).

P. Halada (*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of Czech Republic, Praha, Czech Republic*):
Approaches to Current Phosphoproteomics

Characterization of post-translational modifications is one of the major challenges in proteomics. Reversible phosphorylation on serine, threonine and tyrosine residues is involved in regulation of many fundamental cellular events such as cell cycle, signal transduction, metabolism, and protein synthesis. To understand the molecular basis of these regulatory mechanisms, techniques capable of precise identification and quantitation of phosphorylation are needed. This review is devoted to recent trends in phosphoproteomics with special focus on mass spectrometry-based techniques. It covers enrichment of phosphoproteins/phosphopeptides using immobilized metal affinity chromatography and chemical derivatization techniques, phosphopeptide detection using differential peptide mass mapping, neutral loss and precursor ion scanning, localization of phosphorylation sites by tandem mass spectrometry as well as relative and absolute quantitation of phosphorylation stoichiometry.