

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE ROSTLIN



Obohacovací techniky užívané ve fosfoproteomice

(bakalářská práce)

Jan Fíla

Školitel: RNDr. David Honys, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Věra Čapková, CSc.

Praha 2010

Poděkování

Chtěl bych poděkovat školiteli RNDr. Davidu Honysovi, Ph.D. za cenné rady při zpracování bakalářské práce a konzultantce RNDr. Věře Čapkové, CSc. za pročtení práce a připomínky, stejně tak za předání mnohých praktických zkušeností. V neposlední řadě mé díky patří také RNDr. Nikoletě Dupl'ákové za získání prvních laboratorních dovedností během mých začátků v Laboratoři biologie pylu.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně s použitím citované literatury pod vedením RNDr. Věry Čapkové, CSc. a RNDr. Davida Honyse, Ph.D. a souhlasím s jejím zveřejněním.

V Praze, 17.7.2010

.....

Jan Fíla

Abstrakt

Reverzibilní fosforylace proteinů patří mezi nejdynamičtější posttranslační modifikace. Fosforylace hraje důležitou roli v mnoha buněčných procesech, jmenujme např. buněčné dělení, přenos signálu, dynamiku cytoskeletu, regulaci translace, cílení proteinů a metabolismus. Bohužel množství fosfoproteinů v buňce neodpovídá jejich významu, a tak bývá nevyhnutelné využít obohacovacích technik. K obohacení může dojít buď ve formě fosfoproteinů, nebo fosfopeptidů, popř. může být zvolena kombinace obou přístupů. Většina obohacovacích strategií je založena na chemické modifikaci fosfátů, afinitě fosfátu ke kladně nabitě chromatografické matici a na použití protilátek.

Jednotlivé metody mají své výhody i nevýhody. Navíc kompletního a spolehlivého odhalení fosfoproteomu lze obvykle dosáhnout kombinací několika metod. V posledních pěti letech byly mnohé protokoly vylepšeny a další se nově objevily. Tato bakalářská práce tak shrnuje obohacovací metody užívané ve fosfoproteomice.

Klíčová slova: fosfoproteomika, obohacování fosfoproteinů, obohacování fosfopeptidů, IMAC, MOAC, oxid titaničitý (TiO_2), hydroxid hlinitý $\text{Al}(\text{OH})_3$, protilátky

Abstract

Reversible protein phosphorylation represents one of the most rapid and dynamic posttranslational modifications. Phosphorylation plays a key role in many cellular processes as cell division, signal transduction, cytoskeleton dynamics, translation regulation, protein targeting and metabolism. Unfortunately, the importance of phosphoproteins is not mirrored in their abundance so enriching strategies are mostly inevitable. The enrichment can be performed either at the stage of phosphoproteins or at the stage of phosphopeptides. Alternatively, a combination of both strategies can be used. Most enriching strategies are based on chemical modifications, affinity of phosphates to positively-charged chromatography matrix or antibodies.

Every method used has its advantages as well as disadvantages. Moreover, satisfactory coverage of phosphoproteome is very often reached by combination of more methods. In the past five years many protocols have been improved or alternatively new approaches have appeared. So in this bachelor thesis, the available enrichment strategies are reviewed.

Key words: phosphoproteomics, phosphoprotein enrichment, phosphopeptide enrichment, IMAC, MOAC, titanium dioxide (TiO_2), aluminium hydroxide $\text{Al}(\text{OH})_3$, antibodies

Obsah

1. Úvod	4
2. Literární přehled	7
2.1. Obohacování na úrovni fosfoproteinů	8
2.1.1. Protilátky	9
2.1.2. IMAC	10
2.1.3. MOAC	12
2.1.3.1. Hydroxid hlinitý	12
2.1.3.2. Oxid titaničitý	15
2.2. Obohacování na úrovni fosfopeptidů	16
2.2.1. IMAC	17
2.2.2. MOAC	22
2.2.2.1. Oxid titaničitý	22
2.2.2.2. Oxid zirkoničitý	25
2.2.2.3. Hydroxid hlinitý	26
2.2.2.4. Oxidy ostatních kovů	27
2.2.3. Chromatografie s hydroxyapatitem	27
2.2.4. Obohacení fosfopeptidů srážením	28
2.2.5. SCX a SAX	28
2.2.6. HILIC	29
2.2.7. Chemické modifikace	30
3. Závěr	32
4. Použité zkratky	33
5. Literatura	34

1. Úvod

Donedávna byla hlavním přístupem sledujícím expresi genů transkriptomika. Tento přístup se dnes jeví jako nedostatečný, protože přítomnost dané mRNA v buňce nemusí znamenat, že je v buňce příslušný protein zastoupen ve stejné koncentraci (Holmes-Davis et al., 2005; de Groot et al., 2007). Vyšší koncentrace mRNA než odpovídajícího proteinu může být dána transkripcí, která není doprovázena translací dané mRNA, přičemž tento transkript může být v buňce skladován. K podobné situaci dochází i v případě, kdy je protein labilnější než daná mRNA. Opačná situace, tedy vyšší koncentrace proteinu než příslušné mRNA, může být způsobena extrémní stabilitou produkovaného proteinu, vysokým stupněm translace, nebo rychlejší degradací mRNA než daného proteinu.

Výše zmíněné skutečnosti potvrzují důležitost proteomiky, která umožňuje získat realističtější data než poskytuje transkriptomika. Dokonce i přítomnost proteinu v buňce ještě nemusí znamenat, že je opravdu funkční, k tomu je leckdy potřeba posttranslačních modifikací, např. glykosylace, fosforylace nebo acetylace. Fosforylace je velmi dynamickou posttranslační modifikací, jejíž hladina v buňce je přesně regulována celou řadou kináz a fosfatáz.

Fosfátová skupina, která je při fosforylaci proteinu kovalentně připojena na příslušnou aminokyselinu, mění vlastnosti tohoto proteinu. Jeho izoelektrický bod je díky fosfátu posunut do kyselější oblasti (Darewicz et al., 2005). Záporný náboj fosfátu může být zodpovědný za změnu konformace daného proteinu, např. glykogen fosforyláza vlivem fosforylace přechází do aktivní konformace (Fletterick and Sprang, 1982). Takto se může změnit nejen interakce aminokyselin v rámci jednoho proteinu, ale také se mohou pozměnit meziproteinové interakce, např. mezi cytochromem a jeho vazebnými proteiny (Kim et al., 2004). V neposlední řadě může být fosfát navázán do aktivního místa enzymu, a blokovat jeho funkci, např. u izocitrát dehydrogenázy (Garnak and Reeves, 1979).

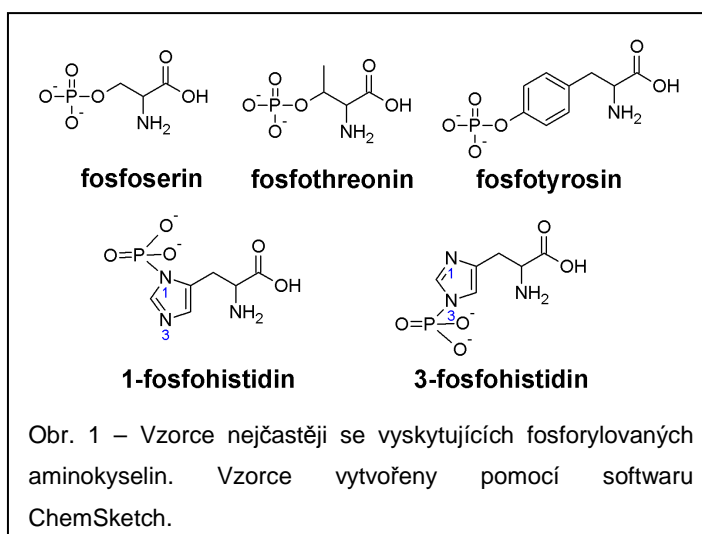
Fosforylace má klíčovou úlohu v mnoha buněčných procesech. Fosforylace příslušných cyklin-dependentních kináz je spjata s přesnou regulací buněčného cyklu (Dephoure et al., 2008). Fosforylační kaskády jsou zodpovědné za přenos vnějšího signálu do buňky, jmenujme například MAP kinázovou kaskádu (Mishra et al., 2006). Dalším místem, kde fosforylace sehrává důležitou úlohu, je dynamika cytoskeletu (Augustine et al., 2008). Mnohé transkripční faktory jsou nasměrovány z cytosolu do jádra díky fosforylaci, např. velký antigen T viru SV40 (Rihs et al., 1991), nebo naopak díky defosforylaci, např. regulační protein SWI5 kvasinky (Moll et al., 1991). V neposlední řadě je pomocí fosforylace

regulován metabolismus, např. inhibiční fosforylace izocitrát dehydrogenázy (Garnak and Reeves, 1979), nebo aktivační fosforylace glykogen fosforylázy (Fletterick and Sprang, 1982). Fosforylace RNA polymerázy II na její C-terminální doméně je důležitá pro elongační fázi transkripce (Baskaran et al., 1997). Fosforylace ribozomálních proteinů se uplatňuje při regulaci translace (Ballesta et al., 1999).

Proteiny nejčastěji nesou fosfát navázaný přes kyslík, jak je tomu u serinu (pS) a threoninu (pT), viz Obr. 1. Menší zastoupení má fosfotyrosin (pY), mající fosfát vázaný rovněž přes kyslík. Poměr pS:pT:pY byl u lidských buněčných kultur stanoven jako 78:18:3,8 (Beausoleil et al., 2004), 86,4:11,8:1,8 (Olsen et al., 2006) nebo 84:14:2,3 (Molina et al., 2007) v závislosti na použitých buňkách, u bakterie *Bacillus subtilis* 70:20:10 (Macek et al., 2007), u *Arabidopsis thaliana* 85:10,7:4,3 (Sugiyama et al., 2008). Původní předpoklad, že u rostlin je fosforylace na tyrosinu zastoupena méně než u živočichů, tak nejspíše nebude pravdivý.

Další fosforylovanou aminokyselinou může být histidin, který váže fosfát přes dusík (viz Obr. 1). Fosfohistidin se vyskytuje ve dvou izoformách, 1-fosfohistidin a 3-fosfohistidin.

Fosforylace histidinu byla popsána zejména u rostlin a bakterií, nicméně i u živočichů lze najít proteiny s fosfohistidinem (Kowluru et al., 1996). U bakterií plní fosforylace histidinu úlohu např. při signalizaci chemotaxe (Birck et al., 1999), zatímco u rostlin je to např. role při přenosu signálu cytokininů (To et al., 2007) a ethylenu (Gamble et al.,



1998). Zajímavostí mnohých fosfohistidinových receptorů je, že přenášejí fosfát na kyselinu asparagovou, a tím ji fosforylují. Tento proces byl popsán u receptoru cytokininů (To et al., 2007). Za zmínku ještě stojí vzácně se vyskytující fosfoarginin a fosfolysin (Besant et al., 2009).

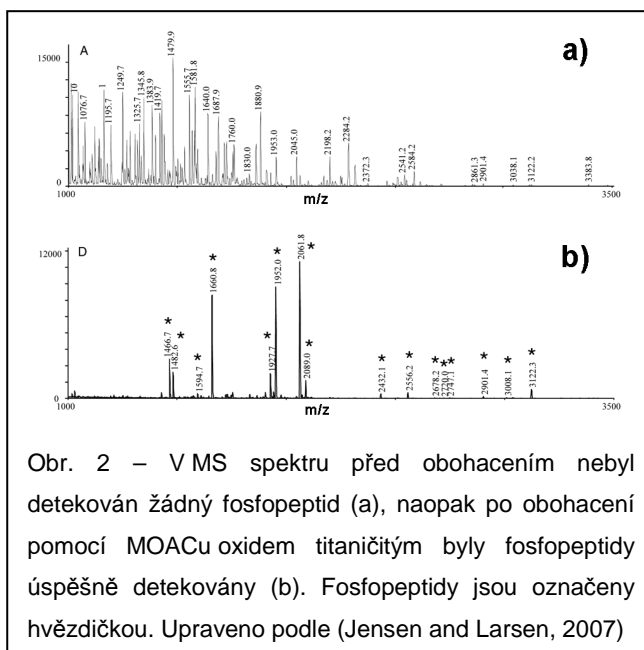
Fosforylované aminokyseliny se liší svou odolností ke kyselému a zásaditému pH. Nadále nebudeme uvažovat o fosfoargininu, fosfolysinu, ani o fosfoaspartátu. Fosfohydroxyaminokyseliny (tedy pS, pT a pY) jsou stabilní za mírně kyselého pH, jejich poločas rozpadu v 1 M HCl při 100 °C je asi 18 h pro pS nebo pT a asi 5 h pro pY (Duclos et al., 1991). Naproti tomu obě izoformy histidinu jsou v kyselém pH nestabilní – 1-fosfohistidin

a 3-fosfohistidin mají poločas rozpadu v 1 M HCl při 49 °C 18 s a 25 s (Hultquist, 1968). Obě izoformy fosfohistidinu a fosfotyrosin jsou stabilní za mírně alkalického pH, zatímco fosfoserin a fosfothreonin jsou za takových podmínek nestabilní.

Labilita fosfohistidinu za mírně kyselého pH vede k tomu, že běžnými fosfoproteomickými technikami, které budou předmětem této bakalářské práce, bývá fosfohistidin nedetekovatelný. Nezřídka se totiž užívá kyselých chemikálií (např. kyseliny trichloroctové) k proteinové extrakci či některý z pufrů při obohacování je slabě kyselý. Chceme-li detekovat fosfohistidin v příslušném vzorku, musíme naše metody tomuto účelu přizpůsobit. Některé z těchto metod jsou shrnuty v recentním přehledném článku (Besant and Attwood, 2009) a nebudou předmětem této bakalářské práce.

V daném okamžiku je v buňce fosforylováno pouze několik procent proteinů. Navíc může být ten samý protein přítomen jak ve své fosforylované tak nefosforylované podobě. Kvůli své nízké koncentraci se obvykle fosfoproteiny ztrácejí mezi abundantnějšími proteiny. Navíc fosfopeptidy bývají při hmotnostní spektrometrii méně úspěšně ionizovány než jejich odpovídající nefosforylované formy. Jsou-li ve vzorku přítomny jak fosfopeptidy tak peptidy nefosforylované, pravděpodobnost ionizace fosfopeptidů, a tím detekce, bývá snížena (viz Obr. 2). Z těchto důvodů je nezbytné provést obohacení o fosfoproteiny/fosfopeptidy, abychom se zbavili nefosforylovaných proteinů/peptidů a dospěli tak k úspěšné identifikaci většího množství z nich, a tím se přiblížili aktuálnímu stavu fosfoproteomu v buňce.

Metody obohacování zaznamenaly v posledních pěti letech výrazný pokrok a navíc se objevily některé metody nové. Je tedy velmi vhodné ty nejpodstatnější z nich i s jejich inovacemi sepsat, a proto jsem se rozhodl psát bakalářskou práci na toto téma. Ačkoli je vylepšení obohacovacích technik doprovázeno a občas i podmíněno pokroky v hmotnostní spektrometrii, inovace MS v této práci popsány nebudou. Není možné detailně obsáhnout všechny obohacovací metody, a tak dopodrobna jsou rozebrány jen ty užívanější, naopak některé méně používané jsou zmíněny jen stručně.

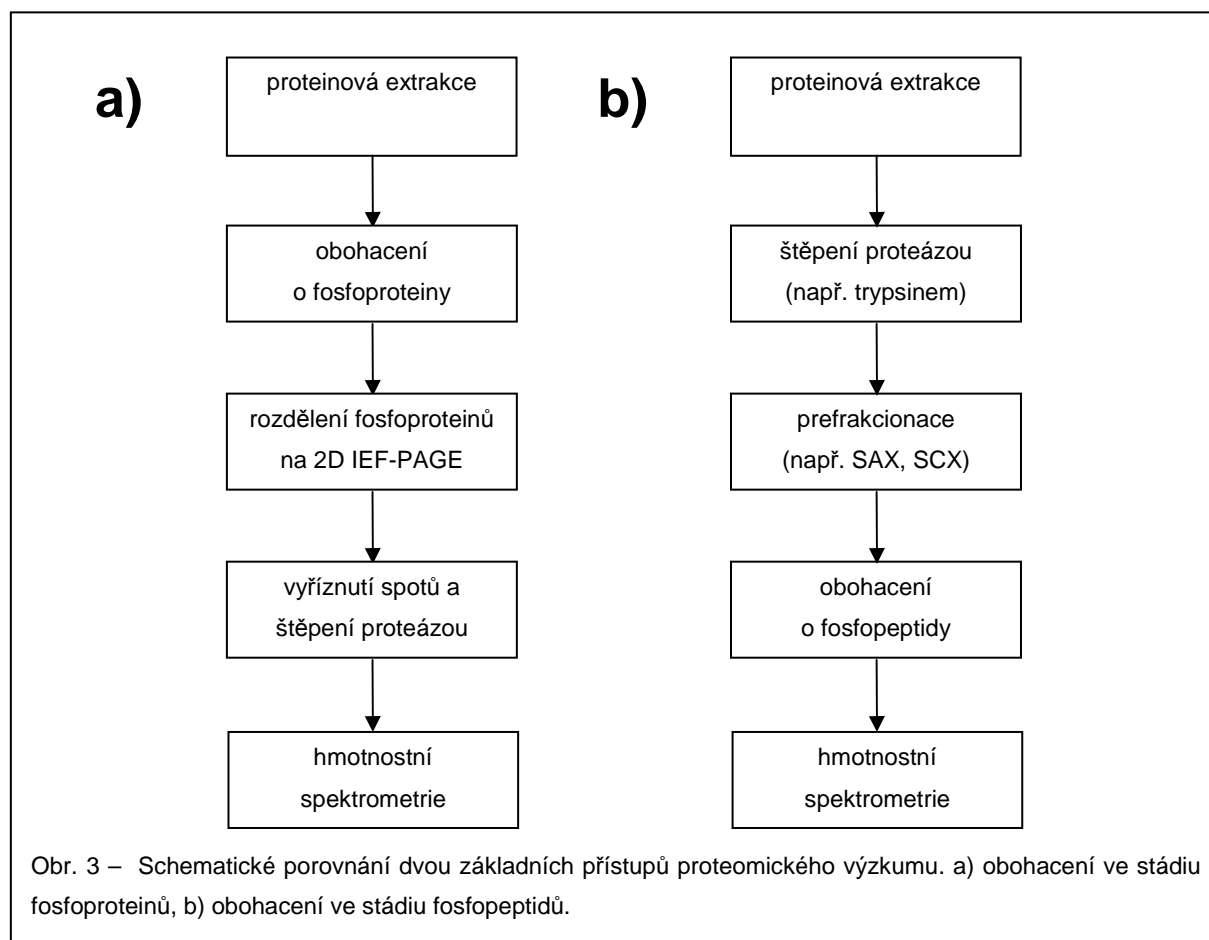


Obr. 2 – V MS spektru před obohacením nebyl detekován žádný fosfopeptid (a), naopak po obohacení pomocí MOACu oxidem titaničitým byly fosfopeptidy úspěšně detekovány (b). Fosfopeptidy jsou označeny hvězdičkou. Upraveno podle (Jensen and Larsen, 2007)

2. Literární přehled

Obohacovací metody užívané ve fosfoproteomice budou v této bakalářské práci tozděleny na ty, jež obohacují o intaktní fosfoproteiny a na ty, které obohacují o fosfopeptidy vzniklé proteolytickým štěpením fosfoproteinů (viz Obr. 3).

Toto dělení slouží jen ke zjednodušení orientace, mnohé metody totiž našly uplatnění v obou strategiích, přičemž pokroky protokolů objevené při obohacování fosfopeptidů jsou využívány i při obohacování fosfoproteinů a naopak. Navíc nezdřídka se využívá přístupu kombinovaného – nejprve se obohacuje o fosfoproteiny a po jejich separaci a štěpení se provádí ještě fosfopeptidové obohacení, nebo se užívá nezávisle obou přístupů v kombinaci s dalšími metodami (např. izotopového značení fosfoproteinů), aby se tak získaly co nejkompletnější informace o fosforylovaných proteinech (Ito et al., 2009). Také se může provádět paralelně obohacení dvěma metodami ze stejného okruhu, např. provádět obohacování o fosfopeptidy pomocí oxidu titaničitého a oxidu zirkoničitého, protože výstupy obou metod se poněkud liší (Mazanek et al., 2010).



2.1. Obohacování na úrovni fosfoproteinů

Tato strategie začíná extrakcí proteinů, kterou je v případě rostlinných vzorků nutno provést s dostatečnou pečlivostí, protože rostlinné buňky jsou ohraničeny buněčnou stěnou a často obsahují rozličné sekundární metabolity. Lze použít různé způsoby extrakce v závislosti na tom, jaké proteiny a v kolika frakcích chceme získat. Celkový extrakt je pak rozpuštěn v pufru, v němž dojde k vychytání fosfoproteinů. Získané fosfoproteiny se obvykle dělí na dvojrozměrné elektroforéze (IEF-PAGE). Na elektroforetogramu se objeví jednotlivé spoty odpovídající nejčastěji jednomu proteinu, občas je ale v jednom spotu identifikováno více proteinů. Spoty, které mají být analyzovány, vyřízneme a proteiny v nich obsažené naštěpíme pomocí specifické proteázy (nejčastěji se užívá trypsin). Získané peptidy jsou podrobeny měření na MS.

Výhodou tohoto přístupu je, že pomocí IEF-PAGE zjistíme izoelektrický bod a molekulární hmotnost daného proteinu. Tyto informace mohou napomoci při identifikaci těchto bílkovin. Vyhledávací algoritmus může najít s vysokou shodou proteiny s extrémním izoelektrickým bodem, takovým, který na našem dvojrozměrném elektroforetogramu nebyl k vidění. Za takové situace nebude pravděpodobné, že se skutečně jedná o tento protein, neboť jeho izoelektrický bod je jiný než je očekáváno. Dalším pozitivem tohoto přístupu je, že jednotlivé proteiny (příp. skupiny proteinů) jsou odděleny. Získané spektrum peptidů tak patří ideálně jednomu proteinu, tudíž jeho identifikace je pravděpodobnější, protože je provedena na základě několika peptidů (nejen těch fosforylovaných), a tudíž sekvence proteinů může být lépe pokryta. Nevýhodou metod obohacujících ve stádiu fosfoproteinů je nedostatečná rozpustnost nebo rozdělitelnost určitých skupin proteinů, příkladně příliš malých, silně lipofilních a těch s extrémním izoelektrickým bodem. Jejich ztráta hrozí také při nevyhnutelných srážecích krocích, např. pomocí methanolu a chloroformu (Wessel and Flügge, 1984), při výměně pufrů.

Mezi metody nejčastěji užívané k obohacování o fosfoproteiny patří protilátky a afinitní metody. Afinitní metody využívají záporného náboje fosfátových skupin, přes něž jsou vázány k pozitivně nabitě matrici, jíž může být kationty kovu na nosiči nebo samostatné částice kovových oxidů nebo hydroxidů. Pro lepší přehlednost jsou kapitoly o afinitních metodách rozděleny podle použité metody, na IMAC (chelatační afinitní chromatografie, angl. immobilized metal affinity chromatography) a MOAC (afinitní chromatografie s využitím kovového oxidu, angl. metal oxid affinity chromatography). Na principu afinity záporně nabitých fosfátů ke kladně nabitě chromatografické matrici fungují i mnohé komerční

kity. Těmi se v tomto přehledu zabývat nebudu, protože neznalost konkrétních složení jejích pufrů neumožňuje diskuzi o přesném principu metody ani diskuzi o optimalizaci metody úpravou složení pufrů.

2.1.1. Protilátky

Protilátky jsou schopny specificky vázat látky s rozličnými epitopy, mj. proteiny. Podstatou této techniky je tedy využití specifických protilátek k vychytání proteinů obsahujících příslušné fosforylované aminokyseliny. Nejširšího uplatnění našla tato metoda v případě vychytávání proteinů fosforylovaných na tyrosinu. Použitým modelem byly např. buňky HeLa (Pandey et al., 2000), kultury B-buněk infikovaných virem Ebstein-Barrové (Imam-Sghiouar et al., 2002) nebo imortalizované buňky odvozené od myeloidní leukemické linie K562 (Lind et al., 2008). Pro rostlinné modely tato metoda příliš využívána nebyla, neboť se předpokládalo, že u rostlin je zastoupení fosfotyrosinu nižší než u živočichů, což se ve světle nových výsledků jeví jinak (Sugiyama et al., 2008).

Problémem protilátek proti fosfothreoninu a fosfoserinu byla jejich nefunkčnost při imunoprecipitačních protokolech (a tedy při obohacování), ačkoli byly dostupné a pro detekci na imunoblotech fungovaly dobře (Grønborg et al., 2002). Další komplikací těchto protilátek bývá, že jsou zacíleny na rozsáhlejší epitop než pouhou fosforylovanou aminokyselinu. Tak se může stát, že určité proteiny jsou lépe vychytány než jiné, např. určité protilátky proti pS nebo pT diskriminují místa sousedící s prolinem, naopak jiné protilátky jsou na taková místa cíleny. Přesto byly protilátky v praxi využity k vychytání pT/pS proteinů z celkového extraktu HeLa buněk (Grønborg et al., 2002).

Nevýhodou této metody při využití k rozsáhlému hledání maximálního množství fosfoproteinů je, že pro každou fosforylovanou aminokyselinu je zapotřebí využít služeb jiné protilátky, oproti tomu afinitní metody (MOAC, IMAC) jsou schopny vychytat veškeré fosforylované aminokyseliny. Tato nevýhoda se může proměnit ve výhodu, pokud nás zajímá pouze určitá skupina fosfoproteinů, obvykle se toho využívá pro vychytávání proteinů s fosfotyrosinem. Protilátkové obohacování o pT a pS je limitováno množstvím dostupných protilátek, které dobře fungují při obohacovacích protokolech.

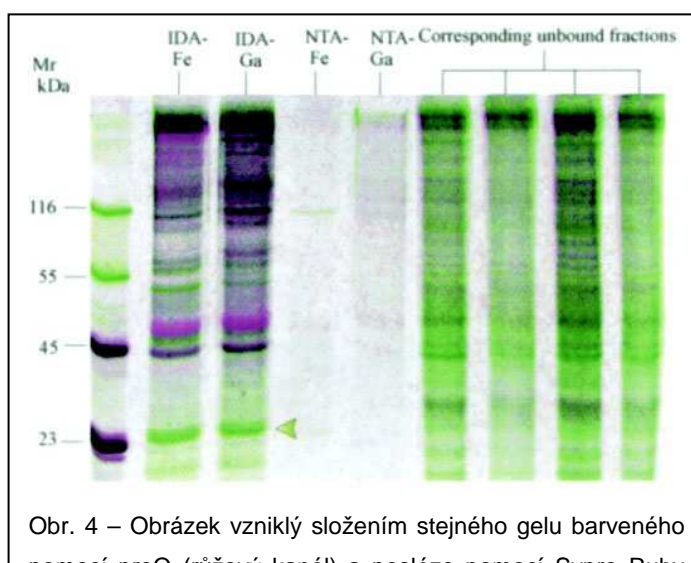
Protilátek bylo využito také při obohacování o fosfopeptidy s fosfotyrosinem (Zhang and Neubert, 2006), v dané sekci se ale touto metodou pro nedostatek prostoru už blíže zabývat nebudu.

2.1.2. IMAC

Tento způsob obohacování je častěji využíván k obohacování na úrovni fosfopeptidů (viz kap. 2.2.1). Matricí této metody tvoří různé nosiče s chelatačním ligandem (informace jsou uvedeny v kapitole o fosfopeptidech), které jsou nabity pomocí kovových kationtů, např. kationty gallitými, železitými nebo nikelnatými. Oproti tomu MOAC užívá jako matrici oxidy nebo hydroxidy kovů.

Problémem, který měla tato metoda při obohacování fosfoproteinů byly signifikantní ztráty proteinů a také inkompatibilita obohacené frakce s dvojrozměrnou elektroforézou. Tyto problémy byly vyřešeny v protokolu užívajícím chelatačního ligandu NTA (kys. nitrilotrioctová) s Fe^{3+} neseného na agaróze (Dubrovská and Souchelnytskyi, 2005). Buněčný extrakt z lidské buněčné kultury MCF10A v lyzačním roztoku (1 % Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8,0) byl inkubován společně s matricí. Navázané proteiny byly šestkrát promyty promývacím pufrem (5 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 6,3) a fosfoproteiny byly uvolněny pomocí elučního pufru (100 mM DTT, 2 % SDS, 50mM Tris-Cl, pH 6,8) inkubací po dobu 5 min při 95 °C.

V další studii otestovali kombinaci dvou nosičů s chelatačními ligandy (sefaróza-IDA a agaróza-NTA) se dvěma kovovými kationty (železitými a gallitými), z čehož se ligand IDA ukázal být lepší variantou než NTA a gallité ionty poněkud efektivněji vychytávaly fosfoproteiny než ionty železité (Collins et al., 2005), Obr. 4. Pro další pokusy na synaptosomech myši byl zvolen sefaróza-IDA s Ga^{3+} . Ačkoliv k obohacení došlo, na elektroforetogramu eluátu bylo k nalezení několik málo proteinů, které se na fosfát-specifickém ProQ barvivo téměř neobarvily a byly detekovány až barvivem Sypro Ruby



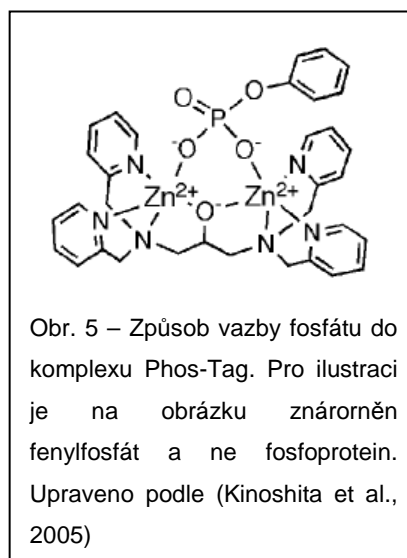
Obr. 4 – Obrázek vzniklý složením stejného gelu barveného pomocí proQ (růžový kanál) a posléze pomocí Sypro Ruby (zelený kanál). Fosforylované proteiny jsou vidět buď černě nebo růžově, zelené bandy odpovídají nefosforylovaným proteinům. Marker obsahoval dva bandy nefosforylované (116 a 55 kDa) a dva fosforylované (45 a 23 kDa). První čtyři vzorky za markerem jsou eluáty za využití různých kombinací chelatačního ligandu + kov, další čtyři vzorky jsou odpadními frakcemi za týchž podmínek. Přítomnost zelených bandů v eluátech svědčí o jisté nespecifitě metody. Zelenou šipkou jsou označeny nefosforylované ribozomální proteiny (jak byly později identifikovány). Převzato z (Collins et al., 2005).

barvicím všechny proteiny. Lze se tedy domnívat, že obohacení není zcela specifické (viz Obr. 4).

Gallitý iont fungoval nejlépe i v další studii na myší fibroblastové kultuře (Machida et al., 2007). Ionty byly vázány nosičem Poros MC. Při porovnání několika kovových iontů (Ga^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Al^{3+}) se jevil jako nejlepší gallitý iont (Ga^{3+}). Vzorek byl rozpuštěn v pufru obsahujícím 50 mM MES a 0,5 M NaCl, pH 5,5. Optimální hodnota pH pufru byla hledána experimentálně, při vyšších hodnotách (tedy pH kolem 6,0 až 7,0) se fosforylované proteiny nezachycovaly, a tak byly vymyty. Při nižších pH, užívaných pro IMAC fosfopeptidů (Posewitz and Tempst, 1999), může docházet k precipitaci některých proteinů. Vyšší molarita chloridu sodného byla také nevhodná, protože v roztoku bylo pak příliš mnoho iontů, které mohly oslabovat interakci fosfátů s gallitými kationty, naopak bez jeho přítomnosti docházelo k vyššímu podílu vazby nescifických proteinů. Fosfoproteiny po dvouhodinové inkubaci a promytí ve stejném pufru byly uvolněny puftrem s 0,2 M fosforečnanem sodným (pH 8,0) inkubací při 60°C po dobu 15 min. V další práci byla také porovnána funkčnost různých iontů (Novotna et al., 2008). Tyto pokusy byly následovány HPLC, ne gelovými metodami separace, jako u předchozí práce. V této studii nedávaly gallité ionty jednoznačně nejlepší výsledky, stejně dobře totiž dopadly i další testované ionty (Fe^{3+} a UO_2^{2+}).

Ačkoli se ve dvou pracích jevil lépe gallitý iont (Collins et al., 2005; Machida et al., 2007), železitý iont navázaný na IDA-agarose byl v praxi také využit (Imam-Sghiouar et al., 2005). V neposlední řadě byl použit chelatační ligand NTA nabitý Ni^{2+} (Lenman et al., 2008) pro obohacení fosfoproteinů ze čtyřdenní buněčné kultury *Arabidopsis thaliana*.

Další metodou založenou na principu IMAC je metoda užívající 1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-olatodizinečnatý komplex, zvaný Phos-Tag, vázaný na agarosu. Tento komplex má na dvou atomech zinku po jednom chybějícím elektronu, a tak je schopen do tohoto místa vázat fosfát, jenž má po jednom přebývající elektronu na dvou kyslíkových atomech (Kinoshita et al., 2005), viz Obr. 5). Lyzát lidských buněk epidermálního karcinomu byl rozpuštěn v inkubačním pufru (0,1 M Tris- CH_3COOH , 1 M CH_3COONa , pH 7,5) a přidán k Phos-Tagu (Kinoshita-Kikuta et al., 2006). Fosfoproteiny se vázaly při pokojové teplotě po dobu 5 min. Po filtraci a trojnásobném promytí byly fosfoproteiny uvolněny elučním puftrem (0,1 M Tris- CH_3COOH , 1 M NaCl a 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7.5). Eluce byla dvakrát



zopakována. Zajímavostí je, že 1 M NaCl nezvládl zabránit nespecifické vazbě proteinů, zatímco u IMACu s Ga^{3+} vázaným na Poros MC svou úlohu zvládl i 0,5 M NaCl (Machida et al., 2007). Namísto chloridu sodného tak byl pro Phos-Tag využit octan sodný, který nespecifické vazbě karboxylových skupin úspěšně zabránil. Naopak v elučním pufru se octan sodný neosvědčil, protože část fosfoproteinů zůstávala uvězněna v matici, tudíž dostal přednost chlorid sodný, který uvolňoval veškeré fosfoproteiny. Dále stojí za zmínku, že se eluční pufr nelišil od inkubačního hodnotou pH, ale pouze složením. K uvolnění tak stačilo přidat chlorid sodný (což je v souladu s předchozími protokoly, kde příliš vysoká koncentrace chloridu sodného bránila vazbě fosfoproteinů k matici) a dihydrogenfosforečnan sodný (což je také v souladu s předchozími výsledky, kde byl dihydrogenfosforečnan v elučním pufru rovněž přítomen). Další zajímavostí této metody je, že v pufrech není přítomen žádný detergent nebo redukční agens a že všechny kroky probíhaly při pokojové teplotě (Kinoshita-Kikuta et al., 2006). Komplex Phos-Tag našel uplatnění také při SDS-PAGE, kde je součástí gelu a způsobuje zpoždění fosforylovaných proteinů při migraci gelem (Barbieri and Stock, 2008), a tak je umožněna separace fosforylované a nefosforylované formy daného proteinu.

Nevýhodou metody IMAC je její možná nespecifita a nedostatečná prověřenost pro obohacování fosfoproteinů. Dalším problémem je nedostatek srovnávacích dat, zůstává tak otázkou, zda-li užívané pufrы a kombinace chelatačních ligandů s kovy jsou skutečně těmi optimálními. Pro práci s rostlinným materiálem je další nevýhodou, že IMAC byl pro obohacování o fosfoproteiny méně užíván na rostlinných modelech. Přesto má metoda svůj význam, protože spektrum metod pro obohacování fosfoproteinů je o něco chudší než spektrum metod pro fosfopeptidové obohacování. I přes svoji možnou nespecifitu může být metoda užitečná jako předfrakcionační technika. Získanou obohacenou frakci je následně možné naštěpit proteázou a podrobit obohacování o fosfopeptidy.

2.1.3. MOAC

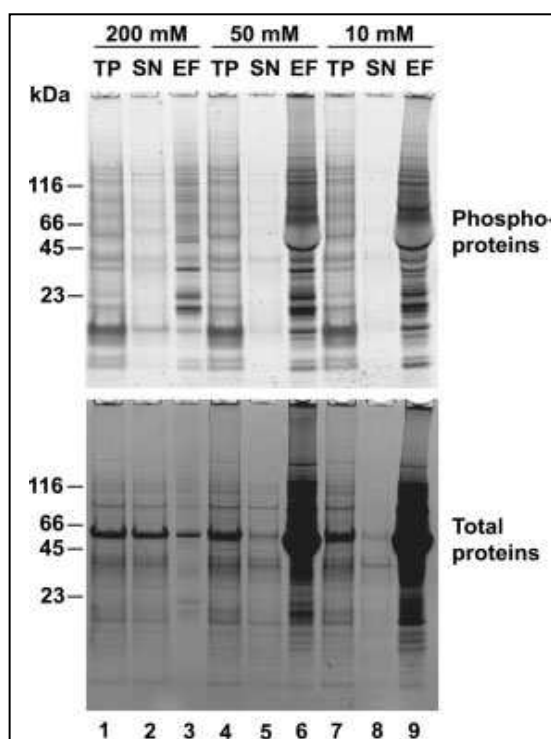
MOAC užívá jako matici oxidů nebo hydroxidů kovů, pro fosfoproteinové obohacení byly užity hlavně hydroxid hlinitý a oxid titaničitý. Zmiňované oxidy/hydroxidy kovů jsou nerozpustné ve vodě a v kyselém pH mají pozitivní náboj a mohou tak pochyvat záporně nabitě fosfoproteiny.

2.1.3.1. Hydroxid hlinitý

Hydroxid hlinitý byl z kovových oxidů/hydroxidů používán pro obohacování fosfoproteinů nejvíce. Optimalizace protokolu byla provedena na základě výsledků získaných

s využitím několika standardních proteinů (Wolschin et al., 2005). Z nich některé byly fosforylovány (pepsin, ovalbumin, α -kasein) a jiné ne (glukóza oxidáza, lysozym, konalbumin, BSA). Optimálním inkubačním pufrům se ukázal být tento: 8 M močovina, 30 mM MES, 20 mM imidazol, 0,2 M aspartát draselný, 0,2 M glutamát sodný a 0,25 % CHAPS, pH 6,1). Po třicetiminutové inkubaci proteinů s matricí je směs stočena a matrice je šestkrát promyta promývacím pufrům o stejném složení jako inkubační pufr. Uvolnění fosfoproteinů je docíleno inkubací matrice s elučním pufrům (100 mM difosforečnan draselný, 8 M močovina, pH 9,5) po dobu 20-ti min.

Nejprve se blíže budeme věnovat složkám inkubačního pufru. Močovina ve vysokých koncentracích spolu s CHAPSem vede k denuraci proteinů, což se ukázalo být v případě vázání fosfoproteinů na chromatografickou matrici výhodné. Po denuraci je totiž přinejmenším částečně zamezena vazba nespécifických proteinů na chromatografickou matrici, což může být způsobeno denurací domén k nespécifické vazbě vhodných. Přidání imidazolu do pufru silně omezilo nespécifickou vazbu histidinu (obsahujícího imidazolový kruh ve své struktuře). Kyselina asparagová a glutamová patří mezi kyselé aminokyseliny, k jejichž nežádoucí vazbě na kladně nabitý hydroxid hlinitý může také docházet. Této nespécifitě lze zabránit přítomností solí těchto aminokyselin v inkubačním pufrům. V původní práci byla použita 0,2 M koncentrace (Wolschin et al., 2005). Taková koncentrace sice vede k vysoké specifitě, zároveň ale může znemožnit vazbu některých slabě se vázajících fosfoproteinů (viz Obr. 6). Koncentrace fosfoproteinů v odpadním supernatantu byla na



Obr. 6 – Elektroforetoqram z optimalizace koncentrace iontů kyselých aminokyselin v nanášecím pufru (200, 50 a 10 mM). Nahoře je fosfát-specifické proQ barvení, dole barvení pomocí SyproRuby. TP = celkový extrakt; SN = odpad bez fosfoproteinů; EF = obohacený eluát. Bližší popis v textu. Převzato z (Röhrig et al., 2008).

gelu dobře detekovatelná (vzorek 2), naopak koncentrace proteinů v eluátu byla příliš nízká (vzorek 3), tudíž byla zkoušena i koncentrace nižší, 0,05 M a 0,01 M (Röhrig et al., 2008). Tyto koncentrace byly naopak příliš nízké, protože nespécifita metody byla příliš vysoká, což lze odvodit z velmi vysoké koncentrace proteinů v eluátu (vzorky 6 a 9) a zároveň téměř

nulové koncentrace proteinů v odpadním supernatantu (vzorky 5 a 8). Rozumným kompromisem mezi specifitou a zahrnutím co nejvyššího počtu fosfoproteinů se tak ukázala být 0,10 M koncentrace při vázání fosfoproteinů a 0,15 M koncentrace během promývacích kroků.

Složení elučního pufru i doba inkubace byly opět experimentálně určeny. Při příliš nízkém pH pufru se nevolňoval protein nejvíce fosforylovaný (v pokusu jím byl α -kasein s osmi fosfáty). Jako efektivnější se ukázal být difosforečnanový pufr než ten fosforečnanový a koncentrace 100 mM (Wolschin et al., 2005). Přesto v další studii autoři domnívají se, že značná část fosfoproteinů zůstává uvězněna v matrici, užívali jako optimální koncentraci dihydrogenfosforečnanu 200 mM (Röhrig et al., 2008).

MOAC byl úspěšně použit k obohacování fosfoproteinů z listů *Arabidopsis thaliana* (Wolschin et al., 2005)a, ze semen *Arabidopsis thaliana*, z řasy *Chlamydomonas reinhardtii* (Wolschin et al., 2005)b a z listů xerofytní rostliny *Craterostigma plantagineum* (Röhrig et al., 2008). Tato metoda může vycytávat fosfoproteiny nejen z komplexních proteinových extraktů, ale také z extraktu z určité buněčné frakce, např. z mitochondrií (Ito et al., 2009). V poslední době se objevila práce odvedená na jiných organizmech než rostlinách, konkrétně na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (Petrova and Sauer, 2009).

Přestože $\text{Al}(\text{OH})_3$ -MOAC byl použit na mnohých modelech, je otázkou, do jaké míry se jedná o specifickou metodu. V originální práci byla předvedena specifita díky obohacování směsi fosforylovaných a nefosforylovaných proteinů (Wolschin et al., 2005), protože nefosforylované proteiny se do matrice nezachytávaly. Dalším pokusem byla defosforylace eluátu pomocí alkalické fosfatázy (Röhrig et al., 2008). Na blotu, barveném pomocí fosfát-specifického barviva proQ, došlo po defosforylaci ke snížení signálu. Takový výsledek naznačuje, že eluát je bohatší o fosfoproteiny, ale otázkou zůstává, kolik obsahoval případných nespecifických proteinů. Alkalická fosfatáza totiž zcela nedefosforyluje všechny proteiny (Fíla, nepublikovaná data), což je celkem logické, zamysleme-li se nad počtem fosfatáz a kináz v buňce a nutnosti jejich alespoň částečné specifity. Slabý signál nemusí být způsoben přítomností fosfoproteinů, může se jednat o obarvení pozadí, barvivo proQ je totiž velmi citlivé a s výrazně menší intenzitou barví také nefosforylované proteiny (Steinberg et al., 2003). Dalším náznakem specifity MOACu s hydroxidem hlinitým je zvýšení poměru fosforu ku síře v eluátu oproti celkovému extraktu při měření pomocí $\mu\text{LC-ICP-MS}$ (Krüger et al., 2007).

Konečně, v naší laboratoři byly provedeny pokusy o defosforylaci celkového proteinového extraktu pylu tabáku a vázání takto ošetřeného extraktu pomocí $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Fíla,

nepublikovaná data). Alkalická fosfatáza bohužel nedefosforylovala veškeré fosfoproteiny, pravděpodobně kvůli své substrátové specifitě. Nekompletně defosforylovaný vzorek se úspěšně vázal na matrici a nebylo tak možné odlišit, zda-li se vázaly proteiny nespecificky nebo neodstraněnými fosfátovými skupinami. Pokusy o defosforylaci pomocí oxidu ceričitého (Tan et al., 2008) nedopadly úspěšně, protože proteiny byly oxidem zachycovány spíše než defosforylovány. Díky nemožnosti kompletní defosforylace celkového extraktu tak naše myšlenka (defosforylovat komplexní vzorek a pokusit se o obohacení) k požadované analýze specifity MOACu nevedla.

2.1.3.2. Oxid titaničitý

Partikulí oxidu titaničitého se v drtivé většině případů používá k obohacování o fosfopeptidy, přesto bylo tohoto oxidu využito i k obohacení o fosfoproteiny (Lenman et al., 2008). Bylo porovnáno obohacení v denaturujícím (6,4 M močovina, 30 mM MES, 20 mM imidazol, 0,2 M aspartát draselný, 0,2 M glutamát sodný a 0,25 % CHAPS, pH 6,1) a nativním pufru (100 mM MES, 200 mM NaCl, 2 % glycerol, 25 mM fluorid sodný, 1 mM molybdát sodný, 0,2 % Tween 20, 0,2 % Triton X-100, 10 μ M leupeptin, 1 nM calyculin A, 1 mM fenylmethylsulfonyl fluorid a 1 mM orthovanadát sodný, pH 6,1). Po dvouhodinové inkubaci byla matrice dvakrát promyta stejným pufrům. Eluce fosfoproteinů byla provedena následujícím pufrům: 200 mM Na₂HPO₄, 75 až 100 mM difosforečnan sodný, 0,2 % Tween 20 a 0,2 % Triton X-100, za denaturačních podmínek navíc 6 M močovina.

Zajímavostí je, že každý ze standardních fosfoproteinů bylo možné zachytit a uvolnit jen jedním typem pufru. Použitelnost této metody na komplexním vzorku byla testována na čtyřdenních buněčných kulturách *Arabidopsis thaliana* (Lenman et al., 2008). Obojí podmínky byly funkční a lišily se získaným spektrem fosfoproteinů, napovídající tak o vhodnosti užití rozdílných podmínek k získání co nejširšího spektra fosfoproteinů. Ačkoliv autoři uvažují o rozdílu mezi denaturujícími a nativními podmínkami, sám bych vzal v úvahu také poměrně odlišné složení obou pufrů a vyzkoušel nedenaturující pufr podobného složení jako byl pufr denaturující. Složení pufru totiž silně ovlivňuje, které proteiny budou solubilizovány, popř. které proteiny budou extrahovány, jedná-li se o proteinovou extrakci (Sheoran et al., 2009). Navíc přítomnost inhibitorů fosfatáz (např. vanadátu a calyculinu) vede ke zhoršené specifitě metody při obohacování o fosfopeptidy (Aryal and Ross, 2010).

Obohacování fosfoproteinů pomocí oxidu titaničitého bylo porovnáno s vychytáváním fosfoproteinů pomocí IMACu za využití chematačného ligandu NTA s Ni²⁺ (viz kapitola 2.1.2). Oba způsoby obohacování se lišily získaným proteinovým spektrem. V každém

případě se nejspíše jedná o odlišný způsob vazby fosfoproteinů, což favorizuje pokaždé jiné fosfoproteiny. Této hypotéze odpovídá i to, že u každé z metod byla vazba fosfoproteinů blokována jinou látkou. Vazba k oxidu titaničitému byla blokována přítomností fosfátu a ne imidazolu, zatímco Ni-NTA se choval přesně naopak.

Nevýhodou této metody je, že při obohacování fosfoproteinů nebyla šíře aplikována a tudíž hrozí, že není plně optimalizována. Otázkou zůstává i její specifita.

2.2. Obohacování na úrovni fosfopeptidů

Při tomto přístupu se také nejprve extrahují proteiny. Extrakt z celé buňky bývá příliš komplexní, a tak je vhodné provést vícekrokovou extrakci proteinů – např. v případě rostlin oddělit cytosolické, membránové a stěnové proteiny, jak bylo provedeno při extrakci proteinů z pylu *Arabidopsis thaliana*, (Holmes-Davis et al., 2005) – nebo provést negelovou prefrakcionaci pomocí některé chromatografické metody (např. SAX, SCX, HILIC). Proteiny lze také rozdělit gelovými metodami (SDS-PAGE, 2D IEF-PAGE) a vyříznout pouze protein, který nás zajímá a s tím dále pracovat. Velmi vhodné je fosfopeptidové obohacování, pokud se zabýváme pouze určitou buněčnou frakcí, např. mitochondriálními proteiny (Ito et al., 2009).

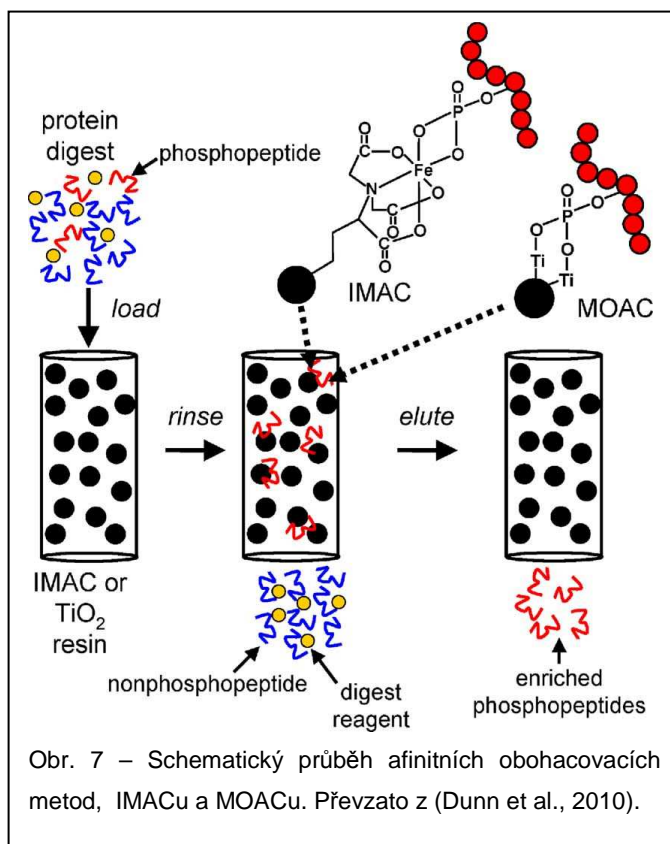
Buď celkový extrakt (pokud je méně komplexní) nebo jeho jednotlivé frakce jsou podrobeny štěpení specifickou proteázou. Získá se tak směs peptidů, mezi nimiž jsou i peptidy fosforylované a jinak modifikované. Po obohacení získáme frakci fosfopeptidů, která je podrobena měření na MS a následně je identifikována.

Výhodou tohoto přístupu je, že peptidy představují méně komplexní struktury než celé proteiny, takže riziko nespecifity by mělo být nižší než v případě proteinů. Dalším pozitivem je, že velmi malé, silně lipofilní proteiny a ty s extrémním pH nebudou znevýhodněny, jak se tomu může stát při rozpouštění a srážení za využití fosfoproteinového obohacování. Výhodou je také značné množství studií těmito metodami provedených.

Negativem je rozštěpení proteinu na jednotlivé peptidy. Obohacená frakce je směsí všech fosfopeptidů, ztrácí se tedy případný společný původ několika peptidů (bílkovina může samozřejmě obsahovat více fosforylačních míst, a tak bude rozštěpena na několik různých fosfopeptidů), protože ho nelze určit. Identifikace fosfoproteinu tak závisí na jediném fosfopeptidu. Nepomohou nám nefosforylované peptidy vzniklé z daného proteinu, protože těch jsme se zbavili při obohacovacím kroku. Identifikace proteinu podle jediného fosfopeptidu může být značně komplikovaná zejména u proteinů obsahujících doménu, která je vlastní více bílkovinám. Problémy může identifikace na základě jednoho fosfopeptidu

přinášet při také práci s plně neosekvenovanými organizmy. V takovém případě může při identifikaci pomoci přítomnost většího množství peptidů daného proteinu, i těch nefosforylovaných. Při hledání v databázi a rozhodování se o relevanci získaných výsledků nám může pomoci znalost molekulární hmotnosti a izoelektrického bodu, tedy údajů, které při obohacování o fosfopeptidy nezískáme, což je další nevýhodou této strategie. Negativem přes všechny snahy zůstává jistý podíl nespecificky vázaných peptidů.

Mezi užívané metody obohacující o fosfopeptidy patří afinitní metody (MOAC, IMAC, chromatografie s hydroxyapatitem, viz Obr. 7), chemické modifikace, protilátky a selektivní srážení



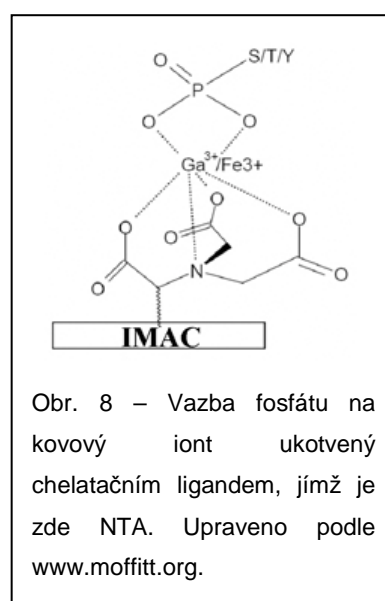
Obr. 7 – Schematický průběh afinitních obohacovacích metod, IMACu a MOACu. Převzato z (Dunn et al., 2010).

fosfopeptidů. Za metody spíše prefrakcionační lze považovat iontoměničové chromatografie SAX a SCX a kapalinovou chromatografii HILIC.

2.2.1. IMAC

IMAC využívá kovových kationtů navázaných na určitý chelatační ligand (viz Obr. 8). Tento přehled nebude kompletním výčtem všech použitých protokolů, ale spíše bude pojednávat o jednotlivých vylepšeních zajímavých pro uživatele této metody, např. o řešení problému nespecifity.

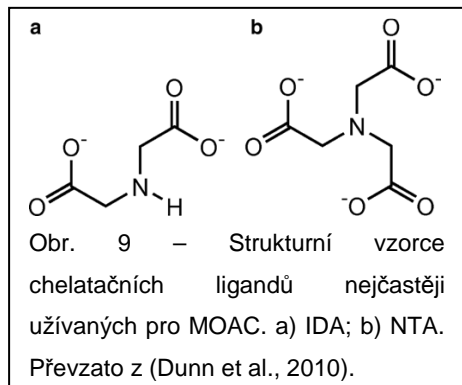
Neužívanějšími chelatačními ligandy jsou kys. iminodiotcová (IDA, viz Obr. 9a) a kys. nitrilotriocetová (NTA, viz Obr. 9b), z užívaných kovů vzpomeňme například kationty železité, gallité, zirkoničité a hlinité (Dunn et al., 2010). NTA při použití s Fe^{3+} vedlo k lepší specifitě než IDA (Neville et al., 1997), ale ve jiné studii užívající Ga^{3+} bylo lepší variantou IDA (Posewitz and Tempst, 1999). Ačkoli výsledky favorizují využití



Obr. 8 – Vazba fosfátu na kovový iont ukotvený chelatačním ligandem, jímž je zde NTA. Upraveno podle www.moffitt.org.

gallitých iontů (Posewitz and Tempst, 1999), velká většina pokusů byla provedena s matricemi vázajícími železité ionty.

Pro zlepšení specifity je nutné inkubační pufr okyselit kyselinou octovou (optimální se jevílo pH 2-2,5), přičemž důležitou složkou tohoto pufru byl i acetonitril, který zabraňuje



vazbě nescifických hydrofobních peptidů do matrice (Posewitz and Tempst, 1999). Fosfát má své pKa přibližně při pH 2,1, zatímco kyseliny glutamová a asparagová při pH 3,65 resp. 4,25 (Kokubu et al., 2005). Je potřeba podotknout že tato čísla se vztahují na samostatné aminokyseliny a fosfát, v rámci peptidu mohou být tyto hodnoty posunuty. Při pH mezi těmito hodnotami (tedy zmíněné pH 2-2,5) jsou většinou

protonovány pouze kyselé aminokyseliny, a tak je skryt jejich záporný náboj, čímž by se měla snížit jejich afinita k matrici. Na stranu druhou fosfát většiny fosfopeptidů protonovaný není, tudíž se může svým záporným nábojem úspěšně vázat. Podle jistých úvah je optimální pH inkubačního pufru ve skutečnosti kompromisním bodem, při němž se dostatečně silně vážou k matrici fosfopeptidy, a tak nedochází k jejich ztrátě, a na druhou stranu se téměř nevážou kyselé nescifické peptidy (Tsai et al., 2008). Jen ve velmi kyselých pH (kolem 1 až 1,5) je totiž možno docílit úplné protonace kys. glutamové a asparagové a naopak jen za pH vyššího než 3 se zcela deprotonují fosfopeptidy.

Kromě optimálního pH sehrává svou roli i iontová síla inkubačního roztoku (Ndassa et al., 2006). Byly porovnány dva pufrы o odlišném složení, konkrétně 25 % acetonitril, 1 % kys. octová, 100 mM NaCl (Ficarro et al., 2002) oproti 33,3 % acetonitril, 33,3 % methanol, 0,01 % kyselina octová (Ndassa et al., 2006). Snížení koncentrace kyseliny octové zlepšilo specifitu metody. Navíc za žádných podmínek chlorid sodný nezlepšoval specifitu metody, tudíž nebyl v novém roztoku obsažen. Podobně neměl NaCl do 1 M koncentrace žádný vliv na specifitu (Kokubu et al., 2005). Dlužno podotknout, že Ndassa se svými kolegy peptidy modifikoval pomocí esterifikace, narozdíl od mnohých jiných prací, které se tomuto kroku snažily vyhnout.

V další studii peptidy esterifikovány nebyly a přesto bylo dosaženo vysoké specifity (Kokubu et al., 2005). Nanášecí pufr byl tentokrát o následujícím složení: 50 % acetonitril, 0,3 % kys. trifluoroctová. Srovnáním efektivity jednotlivých kyselin při vytěšňování negativně nabitých peptidů se dospělo k následující řadě: kys. trifluoroctová (TFA) ≥ kys. chlorovodíková > kys. mravenčí > kys. octová. Úspěšnost vytěšňovat kyselé peptidy tedy

víceméně pozitivně korelovala se silou kyseliny. Ačkoli TFA byla nejuspěšnější, je zapotřebí ji dodat ve správné koncentraci, nízká koncentrace není úspěšná pro diskriminaci kyselých peptidů, zatímco příliš vysoká koncentrace zabraňuje vazbě fosfopeptidů. V další studii se uvažuje, že nejde o nižší pKa TFA než kys. octové, ale spíše o atomy fluoru, které napomáhají selektivě metody (Tsai et al., 2008). Tsaiovi a jeho kolegům vyšla jako selektivnější látka kys. octová. Kys. fluoroctová se jevila jako nevhodná, protože kromě soutěžení o vazbu s nespecifickými peptidy vedla souboj i s fosfopeptidy, a tak způsobovala jejich ztrátu. Tsai s kolegy navrhl užití vyššího pH pro inkubační pufr než bylo do té doby obvyklé (nad pH 3,5), vede to podle jejich dat k vyšší senzitivě metody a pokud se dodá dostatečně vysoká koncentrace kys. octové (6 %), selektivita metody ohrožena není. Jedině za vyššího pH je dosaženo dostatečné deprotonace všech fosfátů, a tak by se měl ztrácet menší podíl fosfopeptidů. Případné deprotonované karboxylové skupiny kys. glutamové a asparagové jsou nuceny soutěžit o vazbu s kys. octovou, která vede v dostatečné míře k vytěsňování kyselých peptidů.

Pro blokaci nespecifických hydrofobních interakcí peptidů s matricí se užívá obvykle acetonitril, což se ukázalo být smysluplné, protože stejný úkol nebyl dostatečně splněn samotnými methanolem, ethanolem nebo acetonem (Kokubu et al., 2005).

Dále pro zvýšení specifiity dobře zafungoval 1,1,1,3,3,3-hexafluorizopropanol (Barnouin et al., 2005). Barnouin s kolegy poukázali také na to, že užívání kaseinu coby standardu může vést k mírně zkresleným výsledkům, protože kasein produkuje svým štěpením kyselá peptidy. Vázání fosfopeptidů je nejspíše kyselostí umocněno, a tak se jeví jako optimální složení nanášecího pufru takové, které by mohlo vést ke ztrátě bazičtějších fosfopeptidů. V pokuse byly fosfopeptidy ze silně bazického histonu H1 zachyceny s nižší senzitivou než kyselá fosfopeptidy kaseinu. Je tedy dobré brát s jistou rezervou výsledky získané na kaseinových peptidech a nepotvrzené při práci s peptidy jinými.

Kromě optimalizace složení a pH inkubačního pufru je jednou z možností, jak zamezit nespecifické vazbě peptidů, provedení esterifikace karboxylových skupin (Ficarro et al., 2002). Tento nápad ale není optimálním řešením, neboť esterifikace nemusí proběhnout úplně, tudíž hrozí zvýšení komplexity vzorku a nezachycení některých fosfopeptidů. Přesto je třeba připomenout, že v dané studii metoda esterifikace vedla ke zvýšení specifiity a byla úspěšně použita při studiu fosfoproteinů z lyzátu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Ficarro et al., 2002).

Dalším způsobem, jak snížit nespecifitu metody je využít ke štěpení jiné proteázy než nejčastěji užívaného trypsinu (Seeley et al., 2005). Proteáza glu-C štěpí aminokyselinový

řetězec za kyselinou glutamovou a asparagovou, takže ve většině peptidů není přítomno více kyselých aminokyselin než jedna. Trypsinové peptidy mohou běžně obsahovat kyselých aminokyselin více. Za použití této proteázy tak došlo ke snížení počtu extrémně kyselých peptidů. Protože se k matici vážou nespecificky zejména kyselé peptidy, dospělo se k vylepšení specifiky metody. Zajímavé je, že při využití proteázy glu-C následovaném ZrO₂-MOACem ke snížení nespecifiky nedošlo (Kweon and Hakansson, 2006). To může být způsobeno odlišnou povahou nespecifických vazeb ke Ga³⁺ v IMACu a ZrO₂ v MOACu.

Neméně důležitou součástí protokolu je složení elučního pufru. Nejprve byly fosfopeptidy z IMACu uvolňovány pomocí kyseliny fosforečné, jejíž ionty musely být před MS odstraněny (Posewitz and Tempst, 1999). Z tohoto důvodu byla zavedena eluce pomocí roztoku hydroxidu amonného o pH 10,5, jež fungovala dobře hlavně pro Ga³⁺-IMAC. Při využití železitých iontů bohužel zůstávaly fosfopeptidy částečně vázány na matici.

Další z užívaných elučních směsí pro uvolňování fosfopeptidů z Fe³⁺-NTA byl roztok obsahující 2,5-dihydroxybenzoovou kyselinu (DHB), jednu z alternativ pro tvorbu matrice při MALDI MS (Hart et al., 2002). Je tak možné fosfopeptidy uvolnit z matrice IMACu a rovnou nanést na ocelový nosič pro MALDI MS. Mnohonásobně fosforylované peptidy nebyly uvolněny, a tak bylo nutné provádět další kolo eluce pomocí pufru s dihydrogenfosforečanem amonným, který naštěstí příliš neinterferuje s MS technikami. Mnohonásobně fosforylované peptidy i ty jednou fosforylované se podařilo uvolnit naráz pomocí směsi DHB a kyseliny fosforečné (Stensballe and Jensen, 2004). Kyselina fosforečná navíc zesilovala signál na MALDI MS, čímž zvyšovala šanci na úspěšnou detekci méně zastoupených fosfopeptidů. Jakkoli je DHB výhodné pro uvolňování před MALDI MS, tak je nevhodné pro eluci před ESI MS. (Imanishi et al., 2007) proto vyvinuli eluční roztok obsahující kyselinu fosforečnou v kombinaci s acetonitrilem, který podle jejich výsledků uvolňoval větší podíl fosfopeptidů než ostatní eluenty. Ve Ndassově studii byly rovněž porovnávány eluční pufrы o různém složení. Nejlépe dopadla kys. sulfosalicylová, nepříliš hůře si vedly kys. nitrooctová, kys. octová a DHB (Ndassa et al., 2006).

Další nutností pro IMAC a další metody je pečlivě provedená proteinová extrakce, aby bylo docíleno odstranění nukleových kyselin, které se vážou na matici IMACu a mohou vést ke ztrátě fosfopeptidů (Li et al., 2009). Nutnost zbavit proteinové vzorky nukleových kyselin není ničím novým, neboť je nezbytným krokem i při použití dvojrozměrné elektroforézy, u níž mohou nukleové kyseliny narušit izoelektrickou fokusaci.

Přítomnost detergentů interferuje s vázáním fosfopeptidů k matici a vede ke zvýšenému zastoupení vícenásobně fosforylovaných peptidů oproti peptidům

fosforylovaným jen jednou (Jensen and Larsen, 2007). Vícenásobně fosforylované peptidy byly výrazněji zastoupeny i v dalších studiích bez použití detergentů (Ficarro et al., 2002; Nousiainen et al., 2006). Zavedením vhodného pufru a užitím chromatografické kolony o dostatečné kapacitě se tento nežádoucí efekt snižuje (Ndassa et al., 2006).

Jednou a mnohonásobně fosforylované peptidy lze od sebe záměrně oddělit (Thingholm et al., 2008). Tato metoda byla pojmenována SIMAC a je založena na principu odlišné afinity monofosforylovaných a mnohonásobně fosforylovaných peptidů ke chromatografické matici. Nejprve se provede obohacení pomocí IMACu podle (Kokubu et al., 2005). Jednou fosforylované peptidy byly uvolněny za pomoci kyselého roztoku (1 % TFA, 20 % acetonitril, pH 1,0), zatímco ve druhém kroku byly mnohonásobně fosforylované peptidy eluovány alkalickým roztokem (roztok hydroxidu amonného, pH 11,3). Monofosforylované proteiny a nezachycené peptidy byly ještě podrobeny TiO₂-MOACu podle (Jensen and Larsen, 2007). I ve frakci s nezachycenými peptidy se totiž nalézaly některé fosfopeptidy a naopak fosfopeptidová frakce byla kontaminována některými kyselými peptidy. Kombinace IMACu s MOACem tak posílila specifitu metody. SIMAC byl s úspěchem aplikován na extrakt z mezenchymálních buněk a vedl k identifikaci většího množství fosfopeptidů než MOAC samotný (Thingholm et al., 2008). SIMAC byl efektivnější zejména v obohacování o mnohonásobně fosforylované peptidy.

Samotný IMAC byl použit při obohacování mnohých komplexních vzorků, jmenujme například kvasinku *Saccharomyces cerevisiae* (Ficarro et al., 2002), proteinový extrakt z mozku myši (Kokubu et al., 2005) z rostlinných prácí pak membránové proteiny *Arabidopsis thaliana* (Nuhse et al., 2004).

Metoda se několikrát ukázala být méně selektivní než MOAC s oxidem titaničitým nebo zirkoničitým (Larsen et al., 2005; Kweon and Hakansson, 2006; Zhou et al., 2007; Aryal and Ross, 2010), srovnatelná specifita byla pozorována např. v Tsaiově práci (Tsai et al., 2008). Další nevýhodou metody je narozdíl od MOACu inkompatibilita s chelátorem EDTA (Jensen and Larsen, 2007), jenž může být nápomocný jako inhibitor fosfatáz (fosfatázy často požadují ke své aktivitě hořčnaté ionty, které EDTA vyvazuje) a jenž by zbavil chelatační ligand neseného kovu. Bohužel i přítomnost detergentů interferuje s IMACem silněji než s TiO₂-MOACem (Jensen and Larsen, 2007).

Výhodou metody je její dlouhá tradice a množství dostupných dat. V publikacích je předveden dostatek možností, jejichž optimalizací lze protokol nastavit tak, aby vedl k dobrým výsledkům. Tato data jsou také použitelná k inspiraci při zlepšování specifity protokolů na MOAC. Kombinací s TiO₂-MOACem vznikl nový protokol, SIMAC

(Thingholm et al., 2008). Nelze rovněž opomenout fakt, že IMAC může sloužit jako samostatná metoda přinášející odlišné spektrum fosfopeptidů, a tak v kombinaci s ostatními metodami (fosforamidátová chemicko-modifikační metoda a TiO₂-MOAC) může pokrýt větší část fosfoproteomu (Bodenmiller et al., 2007). Rozhodně se tak nejedná o metodu zavrženou, mimo jiné i z důvodu mnohých rozsáhlých studií díky ní s úspěchem provedených (viz předchozí odstavec).

Závěrem je dobré připomenout, že těžko lze vybrat z výše zmiňovaných vylepšení jedinou nejlepší cestu. Je potřeba si uvědomit, že IMAC (a potažmo jiné metody) může vést k odlišně spolehlivým výsledkům v závislosti na vnášeném vzorku. Navíc nesmíme zapomenout, že i ty nejnadějnější poznatky získané na syntetických a standardních směsích peptidů, nemusí znamenat, že metoda zafunguje se stejnou efektivitou pro komplexní vzorek. Optimální protokol se může lišit také podle užitého typu ionizace při MS (ESI versus MALDI). Navíc ne všechny kombinace chemikálií, postupů a peptidů byly v praxi vyzkoušeny, tudíž optimum metody může zůstat skryto v nějaké nevyzkoušené kombinaci vylepšení.

2.2.2. MOAC

MOAC využívá jako chromatografické matrice různé kovové oxidy. Fosfátové skupiny jsou vychytány díky svému negativnímu náboji. Fosfopeptidy jsou u těchto metod zachycovány zpravidla za nízkého pH, princip odlišné míry protonace fosfátu a kyselých aminokyselin je stejný jako v případě IMACu. Tento rozdíl v protonaci fosfátu a kyselých aminokyselin opět nebývá dostatečný, a tak je nutné využít aditiv, která blokují vazbu nespecifickou, přičemž vazbu fosfopeptidů umožňují.

2.2.2.1. Oxid titaničitý

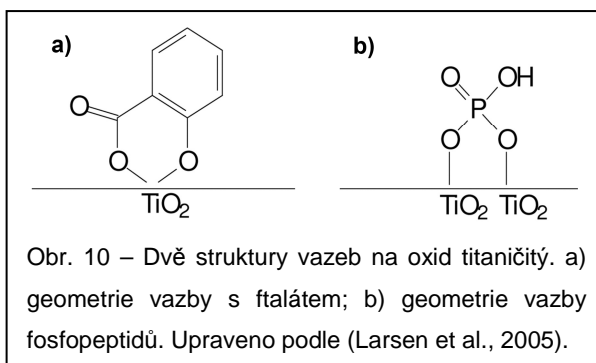
Oxid titaničitý byl pro obohacování fosfopeptidů metodou MOAC využíván nejhojněji, tudíž jeho další využití je výhodné z hlediska množství dostupných experimentálních dat a potažmo z hlediska dostatku dostupných vylepšení protokolu.

V první práci, jíž se budu zabývat, byl oxid titaničitý nejprve využit k obohacování syntetických fosfopeptidů a peptidů pocházejících z kravské protein kinázy G (Pinkse et al., 2004). Fosfopeptidy byly uvolňovány pomocí pufru o následujícím složení: 250 mM hydrogenuhličitan amonný, pH 9. Metoda sice vedla k obohacení o fosfopeptidy, ale rovněž se v menší míře vázaly i kyselé peptidy. Autoři se snažili tento efekt obejít pomocí methylesterifikace karboxylových skupin, podobně jako v případě IMACu (Ficarro et al.,

2002). Jenže v další studii bylo ukázáno, že tato chemická modifikace neprobíhá se stoprocentní účinností, a tak by mohlo dojít k nežádoucímu zvýšení komplexity vzorku (Larsen et al., 2005).

Larsen s kolegy pozměnili podmínky eluce fosfopeptidů, protože zjistili, že po eluci roztokem o pH 9 je možno uvolnit další fosfopeptidy pomocí hydroxidu amonného (pH 10,5).

Původně se nanášely fosfopeptidy k obohacování na oxidu titaničitým v 60 %-ním roztoku akrylamidu okyseleném kyselinou octovou (0,1–0,25 M, pH 2,7–2,9), vyšší selektivity lze ale dosáhnout okyselením 0,1 % kys. trifluorooctovou (Larsen et al., 2005). Později byly ještě vyzkoušeny vyšší koncentrace, 5 % a 10 %, z nichž obě se dají v praxi použít (Jensen and Larsen, 2007).



Tendence blokovat nespecifickou vazbu peptidů klesající v řadě kys. trifluorooctová > kys. fluorooctová > kys. octová byla pozorována i v nedávné práci na kaseinových peptidech (Aryal and Ross, 2010). Lépe se v této recentní studii projevila 1 %-ní koncentrace než 0,1 %-ní nebo 5 %-ní. Při použití samotných kyselin octové nebo jejich fluorovaných derivátů se určité peptidy vázaly nespecificky, a tak se autoři rozhodli přidat kompetitivní vyvazovač kyselých peptidů, 2,5-dihydroxybenzoovou kyselinu (DHB) (Larsen et al., 2005).

DHB bylo vyzkoušeno v nejrůznějších koncentracích, přičemž přítomnost falešně pozitivních peptidů negativně korelovala s koncentrací: 0, 1, 10 a 20 mg.ml⁻¹. Je dlužno podotknout, že předchozí pokusy byly prováděny s fosfopeptidy získanými štěpením jediného proteinu. Výsledky se středně komplexním vzorkem fosfopeptidů smíchanými s nefosforylovanými peptidy podpořily smysluplnost vylepšení. V komplexním vzorku bylo potřeba přidávat DHB ve větší koncentraci (200 mg.ml⁻¹), aby zvládalo úspěšně blokovat vázání nespecifických peptidů. Důvodem, proč i vysoká koncentrace DHB soutěží ve vazbě s kyselými peptidy a ne s fosfopeptidy, je patrně odlišný způsob vazby obou skupin k TiO₂ (viz Obr. 10). Tato hypotéza byla potvrzena tím, že kys. fosforečná nebyla schopna kompetovat o vazbu s nespecifickými peptidy, ale naopak spíše konkurovala fosfopeptidům. Různé kyseliny jsou schopny kompetovat s nespecifickým navazováním zhruba v následující sestupné posloupnosti: DHB = kys. salicylová = kys. ftalová > kys. benzoová = kys. cyklohexanová > kys. fosforečná > kys. trifluorooctová > kys. octová. V porovnání selektivity metody dopadl lépe TiO₂-MOAC než IMAC (Larsen et al., 2005). Optimální protokol byl posléze shrnut v Thingholmově článku (Thingholm et al., 2006).

DHB se nakonec neukázalo být po všech stránkách optimálním kompetitorem, protože jeho koeluce s některými fosfopeptidy při LC vedla ke snížení počtu identifikovaných fosfopeptidů na MS (Sugiyama et al., 2007). Kromě toho přítomné DHB způsobovalo ucpávání chromatografické kolony. Proto v této studii byl testován kompetiční efekt alifatických organických hydroxykyselin. Většina hydroxykyselin úspěšně snižovala množství vázaných nefosforylovaných peptidů v případě užití oxidu titaničitého a zirkoničitého, ale ne při použití hydroxidu hlinitého.

. Pro oxid titaničitý fungovala nejlépe kyselina mléčná. Narozdíl od DHB jsou použité hydroxykyseliny hydrofilnější, a tudíž potíže na kapalinové chromatografii nedělají. Zajímavostí je, že aplikace imidazolu, glutamátu a aspartátu (užívaná při obohacování fosfoproteinů a fosfopeptidů pomocí hydroxidu hlinitého) ke stejně výraznému snížení nespecifity nevedla a vždy byly v obohacené frakci přítomny i nějaké nefosforylované peptidy. Na druhou stranu je třeba poukázat na výsledky, při nichž kyselina glutamová ke snížení nespecifity vedla (Wu et al., 2007). Ve stejné studii byla navíc metoda využita pro fosfopeptidové obohacení z komplexního vzorku, lyzátu HeLa buněk. Při tomto pokuse byl lepším kompetitorem laktát než DHB. V recentních pokusech na kaseinových peptidech nepřineslo přidání DHB lepší výsledek než optimalizovaný inkubační pufr bez kompetitoru (Aryal and Ross, 2010).

V Jensenově článku byly další snahy o nahrazení DHB (Jensen and Larsen, 2007). Tentokrát byl testován efekt kyseliny glykolové, jež byla podobně úspěšná jako kyselina ftalová. Bohužel kyselina glykolová soutěžila s nespecifickými peptidy méně úspěšně ve studii jiné (Sugiyama et al., 2007). Nakonec recentní článek přišel s výsledky, kde je se zvyšující koncentrací kys. glykolové zvyšována nespecifita (Aryal and Ross, 2010). Obě prvně zmiňované práce se shodly ve vhodnosti užití kyseliny mléčné. Zvláště se chovala kyselina citronová, která sice snižovala nespecifické vázání, ale také vedla ke snížení vazby monofosforylovaných peptidů (Jensen and Larsen, 2007). Kyselina oktansulfonová (300 mM) v kombinaci s DHB (20 mg.ml⁻¹) taktéž zvyšuje specifitu (Mazanek et al., 2007). V navazujících experimentech byla navýšena koncentrace těchto látek a namísto kyseliny trifluoroctové byla k okyselení inkubačního pufru použita 0,1 %-ní kys. heptafluorobutanová (Mazanek et al., 2010). Aby se autoři vyhnuli potížím, které DHB způsobuje při kapalinové chromatografii, zařadili do protokolu další promývací krok.

Odlišné výsledky v efektivitě kys. glykolové použité k inhibici nespecifické vazby peptidů ve dvou pracích může být způsobena odlišnými vlastnostmi použitých partikulí oxidu titaničitého v závislosti na výrobci (Cantin et al., 2007) nebo odlišnou krystalinitou (Imami et

al., 2008). Selektivitu této metody rovněž ovlivňuje poměr mezi množstvím partikulí oxidu titaničitého a množstvím peptidů (Li et al., 2009)a/b. V Liových pokusech bylo stejné množství extraktu z HeLa buněk bylo podrobena obohacování za pomoci různého množství oxidu titaničitého, čímž se ukázalo, že do určité koncentrace přibývá množství identifikovaných fosfopeptidů, ale pokud se tento práh překročí (u HeLa buněk byl tímto optimem poměr hmotnosti peptidů ku hmotnosti oxidu 1:2 až 1:8), přebytečný oxid titaničitý snižuje množství navázaných fosfopeptidů. Příliš malé množství partikulí naopak nestačí vycytat veškeré fosfopeptidy.

Dále byl sledován vliv různých detergentů na úspěšnost obohacování. Některé detergenty (např. SDS) jsou nejen kompatibilní s obohacováním, ale navíc brání vázání fosfopeptidů k plastovým mikrozkuvkám nebo špičkám, a tak zvyšují koncentraci získaných fosfopeptidů. Bylo totiž dokázáno, že fosfopeptidy mají tendenci se zachycovat na plastových mikrozkuvkách a špičkách (Jensen and Larsen, 2007). Zajímavým nápadem bylo otestovat vliv fosfatázových inhibitorů na specifitu obohacování, mnohé z nich totiž negativní vliv na specifitu mají (Aryal and Ross, 2010).

Nakonec bych chtěl krátce vzpomenout použití magnetických částic oxidu železatoželezitého pokrytými oxidem titaničitým (Chen and Chen, 2005). Jejich výhodou je, že lze použít magnetického pole k jejich zachycení při promývacích krocích.

Obohacování pomocí oxidu titaničitého bylo užito v mnohých fosfoproteomických studiích, například jmenujme práce na HeLa buňkách (Olsen et al., 2006) a embryích zebřiček *Danio rerio* (Lemeer et al., 2008), z rostlinných prací pak vzpomeňme např. výzkum na buněčných kulturách *Arabidopsis thaliana* (Sugiyama et al., 2008).

Závěrem je třeba připomenout, že optimální podmínky se u jednotlivých prací o něco lišily. Navíc nelze opomenout výsledky, které získány na různých pracovištích, si vzájemně protirečily. Před rozsáhlejším výzkumem je tak vhodné provést ve své laboratoři se svým materiálem několik pilotních experimentů a zjistit tak, které podmínky dávají nejspolehlivější výsledky. Jinak platí podobně jako v případě IMACu, že optimální podmínky se mohou lišit podle použitého vzorku i podle typu použitého MS. Podobně je třeba brát s jistou rezervou výsledky získané na standardních proteinech a neproověřené na komplexním vzorku.

2.2.2.2. Oxid zirkoničitý

Oxid zirkoničitý byl poprvé využit k obohacování kaseinových peptidů a při té příležitosti byl porovnán s oxidem titaničitým (Kweon and Hakansson, 2006). Nejprve byla předvedena nezbytnost nízkého pH při obohacování (pH 2-3), aby byly karboxylové skupiny

protonovány a bez náboje, a aby fosfátové skupiny proton nevázaly a měly svůj záporný náboj. Inkubační pufr obsahoval kyselinu mravenčí. Nejlépe fungovalo uvolňování pomocí 0,5 %-ního piperidinu (pH 11,5). Paralelní aplikace tohoto protokolu na TiO₂ a ZrO₂ vedla k lepším výsledkům než IMAC. Rozdíl mezi oběma oxidy byl ve schopnosti vázat jednou a mnohonásobně fosforylované peptidy, první z nich chytal lépe oxid zirkoničitý, ty druhé oxid titaničitý.

V další studii byl nanášecí pufr okyselen pomocí 10 %-ní kyseliny octové (Zhou et al., 2007). Obohacené fosfopeptidy byly uvolněny pomocí hydroxidu amonného (pH 11,5). Metoda fungovala opět lépe než Fe³⁺-IMAC. Je vhodné zmínit využití této metody pro obohacení extraktu z jater myši a také fakt, že k preferenční vazbě monofosfopeptidů nedocházelo.

Dalším vylepšením metody byla aplikace různých přídatných látek blokujících nespecifickou vazbu k ZrO₂. Při použití glykolové kyseliny byl oxid zirkoničitý o něco méně specifický než oxid titaničitý (Jensen and Larsen, 2007). Je dobré připomenout, že tito autoři použili na okyselení nanášecího roztoku 5 %-ní kyselinu trifluoroctovou, ne kyselinu mravenčí. Větší specifity bylo dosaženo aplikací organických hydroxykyselin přítomných v nanášecím pufru (okyseleném rovněž TFA), nejlépe fungovala β-hydroxypropanová kyselina (Sugiyama et al., 2007). V této studii byl ZrO₂ při obohacování komplexního extraktu z HeLa buněk účinný obdobně jako TiO₂. Oproti původní studii (Kweon and Hakansson, 2006) ale ZrO₂ nepreferoval monofosforylované fosfopeptidy.

DHB mělo v další studii výsledky na zvýšenou specifitu a kyselina mléčná na sníženou specifitu obdobně jako pro oxid titaničitý (Aryal and Ross, 2010). V této studii byla znovu pozorována tendence oxidu zirkoničitého preferovat monofosforylované peptidy, narozdíl od první studie ale nebyl ZrO₂ lepší ve vychytávání monofosforylovaných peptidů, ale stejně úspěšný jako TiO₂. Nedávno byly publikovány další výsledky ukazující, že oxid zirkoničitý je obohacování podobně účinný jako oxid titaničitý. Velká část fosfopeptidů byla ale k nalezení jen po obohacení oxidem zirkoničitým a ne po obohacení oxidem titaničitým a naopak (Mazanek et al., 2010). Tyto výsledky poukazují na to, že ve fosfoproteomice bývá smysluplné aplikovat několik technik paralelně.

2.2.2.3. Hydroxid hlinitý

MOAC užívající jako matici hydroxid hlinitý, byl originálně publikován především jako metoda pro obohacování o fosfoproteiny. Už v originálním článku se ale objevuje využití této metody pro obohacování o fosfopeptidy (Wolschin et al., 2005)a. Metoda byla ověřována

na α -kaseinu, který byl po trypsinovém štěpení solubilizován v inkubačním pufru pro MOAC (30 mM MES, 20 mM imidazol, 0,2 M aspartát draselný, 0,2 M glutamát sodný, 0,25 % CHAPS, pH 6,1). Močovina tentokrát nebyla přítomna, protože se nejednalo o proteiny a nebylo tak nutné navozovat denaturační podmínky. Inkubace s matricí a promývání proběhlo stejně jako u fosfoproteinů. Eluce byla navozena ve dvou krocích, elučním puftrem 1 (60 mM difosforečnan sodný, pH 8,3) a poté elučním puftrem 2 (250 mM difosforečnan sodný, pH 8,3). Za zmínku stojí méně zásadité pH než jaké se užívá pro eluci fosfoproteinů. V eluátu se objevily téměř výhradně fosfopeptidy, jenže je třeba mít na paměti, že metoda byla prozkoušena jen na α -kaseinu. Později se glutamát, aspartát a imidazol se neukázaly být tak úspěšnými v kompetici s nespecifickými peptidy a v eluátu byly přítomny i nefosforylované peptidy (Sugiyama et al., 2007).

2.2.2.4. Oxidy ostatních kovů

Pro MOAC byly použity i oxidy dalších kovů, například oxid gallitý, oxid železitý, oxid cíničitý, oxid hafničitý, oxid tantaličný (Leitner, 2010). Jejich společným jmenovatelem je nepřilíš široké využití, a tudíž nedostatek dat, která jsou dostupná. Pro tento fakt a pro nedostatek místa se jimi blíže zabývat nebudu.

2.2.3. Chromatografie s hydroxyapatitem

Nedávno byla publikována další zajímavá afinitně-chromatografická metoda užívající jako matrici hydroxyapatit (Mamone et al., 2010). Již v minulosti byl hydroxyapatit využíván na oddělování fosfoproteinů o různém stupni fosforylace, např. v případě rhodopsinu (Sale et al., 1978). Hydroxyapatit je krystalickou látkou se vzorcem $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Nanášecí pufr obsahující hydrogenfosforečnan draselný (1 M K_2HPO_4 , pH 7,4) vedl ke snížené schopnosti hydroxyapatitu vázat monofosforylované peptidy, což by mohlo být způsobeno konkurenční vazbou hydrogenfosforečnanových iontů na hydroxyapatit. Tento problém byl vyřešen využitím Trisového pufru o stejném pH (20 mM Tris-Cl, pH 7,4). Promývací pufr (20 mM Tris-Cl, 20 % acetonitril, pH 7,2) pomohl zbavit se nespecificky vázaných peptidů. Zajímavostí je možnost fosfopeptidy oddělovat postupně podle množství obsažených fosfátů za pomoci hydrogenfosforečnanového pufru o zvyšující se koncentraci (20 mM, 50 mM a 200 mM K_2HPO_4 , pH 7,2 a konečný krok 1 M K_2HPO_4 , pH 7,8).

Ačkoli metoda vypadá velmi zajímavě a při obohacování o vícenásobně fosforylované peptidy nadějněji než TiO_2 -MOAC, pokud je mi známo, nebyla ověřena v jiné

laboratoři a v původní publikaci byla zkoušena jen na standardních proteinech. Před jejím použitím v praxi je proto nutné provést dostatek kontrolních pokusů.

2.2.4. Obohacení fosfopeptidů srážením

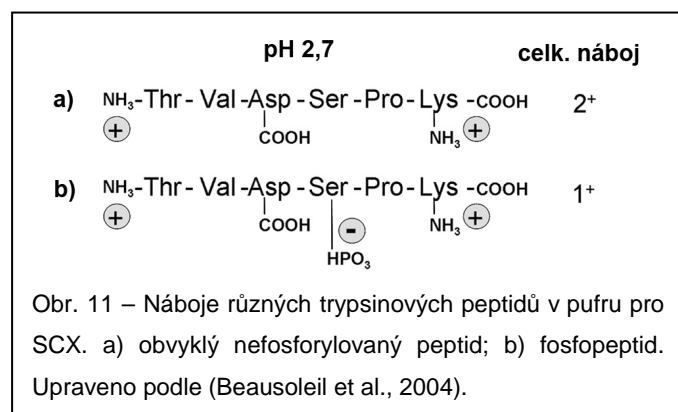
Princip této metody je založen na tom, že z roztoku lze vysrážet fosforečnan vápenatý (Zhang et al., 2007). Vzorek byl nejprve rozpuštěn v roztoku hydrogenfosforečnanu sodného a po přidání chloridu vápenatého došlo k vysrážení fosforečnanu vápenatého společně s fosfopeptidy. Nefosforylované peptidy se nesráží, a tak lze oddělit fosfopeptidovou sraženinu centrifugací. Po promývce lze sediment resuspendovat ve vhodném pufru. Při velmi nízké koncentraci fosfopeptidů oproti koncentraci nefosforylovaných peptidů, byl identifikován jen určitý podíl fosfopeptidů. Navázáním Fe^{3+} -IMACu na precipitaci proteinů došlo ke zlepšení metody a k detekci většího množství fosfopeptidů.

Funkčnost metody spojené s IMACem při aplikaci na rozsáhlý výzkum byla ověřena na proteinovém extraktu z embryí rýže *Oryza sativa* (Zhang et al., 2007). Na extrakt z mozkové tkáně člověka s Alzheimerovou nemocí byla vedle samotného IMACu úspěšně aplikována samotná srážecí metoda (Xia et al., 2008).

Kombinací této metody s IMACem se dosáhne vyšší specifity než bývá běžné u IMACu samotného. Nevýhodou srážecí metody je nedostatečná prověřenost na větším množství modelů. Navíc je otázkou, do jaké míry je metoda nespecifická, v originální studii totiž poukazují na to, že kyselé peptidy by se mohly také dostat do sedimentu (Zhang et al., 2007).

2.2.5. SCX a SAX

SCX a SAX jsou typy kapalinové iontoměníčové chromatografie. Při užití ve fosfoproteomice jsou nejčastěji následovány dalšími obohacovacími technikami, např. IMACem nebo MOACem. Spíše než k obohacování tak tyto metody slouží k získání



subfrakcí, a tím ke snížení komplexity daného vzorku. Obě tyto metody vedou k rozdělení peptidů podle náboje.

Nanášecí pufr pro SCX, kationtovou iontoměníčovou chromatografii má kyselé pH 2,7. Při tomto pH má N-konec peptidu a aminokyseliny lysin, arginin a histidin

pozitivní náboj +1 (viz Obr. 11). Připomeňme, že trypsin štěpí po lysinu a argininu. Je-li na C-konci peptidu jedna z těchto aminokyselin a na N-konci pozitivní náboj aminoskupiny, dojdeme k závěru, že většina trypsinových peptidů má náboj +2. Fosfokupina uděluje peptidu jeden záporný náboj, čímž celkový náboj většiny jednou fosforylovaných peptidů bude +1 a tyto peptidy se budou uvolňovat z kolony jako jedny z prvních (Beausoleil et al., 2004). Nevýhodou metody za daného nastavení je, že jako fosfopeptidy považuje výhradně peptidy o náboji +1. Fosfopeptid obsahující jednu pozitivně nabitou aminokyselinu navíc bude mít náboj +2 a spadne tak mezi nefosforylované peptidy. Naopak dvakrát fosforylovaný peptid má za daných podmínek nulový náboj, třikrát fosforylovaný peptid je dokonce nabit záporně, a tak se tyto vícenásobně fosforylované peptidy nezachytí do stacionární fáze, a tím dojde k jejich ztrátě. SCX lze zkombinovat např. s TiO₂-MOACem (Olsen et al., 2006).

SAX, aniontová iontoměničová chromatografie, využívá podobného principu jako SCX, ale pH nanášecího pufru je slabě kyselé, pH 4,0 (Han et al., 2008). Nefosforylované peptidy jsou na svých karboxylových skupinách ionizovány pouze částečně, zatímco fosfopeptidy obsahují fosfát navíc, a tudíž jsou záporněji nabitě. Na koloně SAXu se tak fosfopeptidy budou vázat silněji a uvolňovat později než nefosforylované peptidy. SAX narozdíl od SCX nevede k možné ztrátě mnohonásobně fosforylovaných peptidů – ty mají nejzápornější náboj, a tedy největší afinitu ke koloně. SAX byl s úspěchem použit v kombinaci s Fe³⁺-IMACem při výzkumu fosforylace membránových proteinů *Arabidopsis thaliana* (Nuhse et al., 2003).

2.2.6. HILIC

HILIC je typem kapalinové chromatografie. Podobně jako SAX a SCX představuje spíše metodu prefrakcionační. HILIC je narozdíl od předchozích typů chromatografií založen na rozdělení peptidů podle hydrofilnosti (McNulty and Annan, 2008). K dělení peptidů je tento typ chromatografie užíván řidčeji než předchozí dva typy. Fosfopeptidy jsou obvykle hydrofilní a nabitě, a proto budou s chromatografickou kolonou interagovat silněji, a tak bude umožněno jejich oddělení od peptidů hydrofobních nebo nefosforylovaných. Jde o metodu prefrakcionace, protože fosfopeptidy nejsou v dané frakci jediné, a tudíž bývá nevyhnutelné využít ještě jiné obohacovací techniky, např. IMAC. Obrácené pořadí metod (IMAC-HILIC) bylo méně vhodné, protože v obohacených frakcích byl značný podíl nefosforylovaných peptidů (McNulty and Annan, 2008). V této studii byl HILIC úspěšně využit jako prefrakcionační krok při zkoumání fosfoproteomu HeLa buněk. Následný IMAC byl specifitější než bez provedení prefrakcionace.

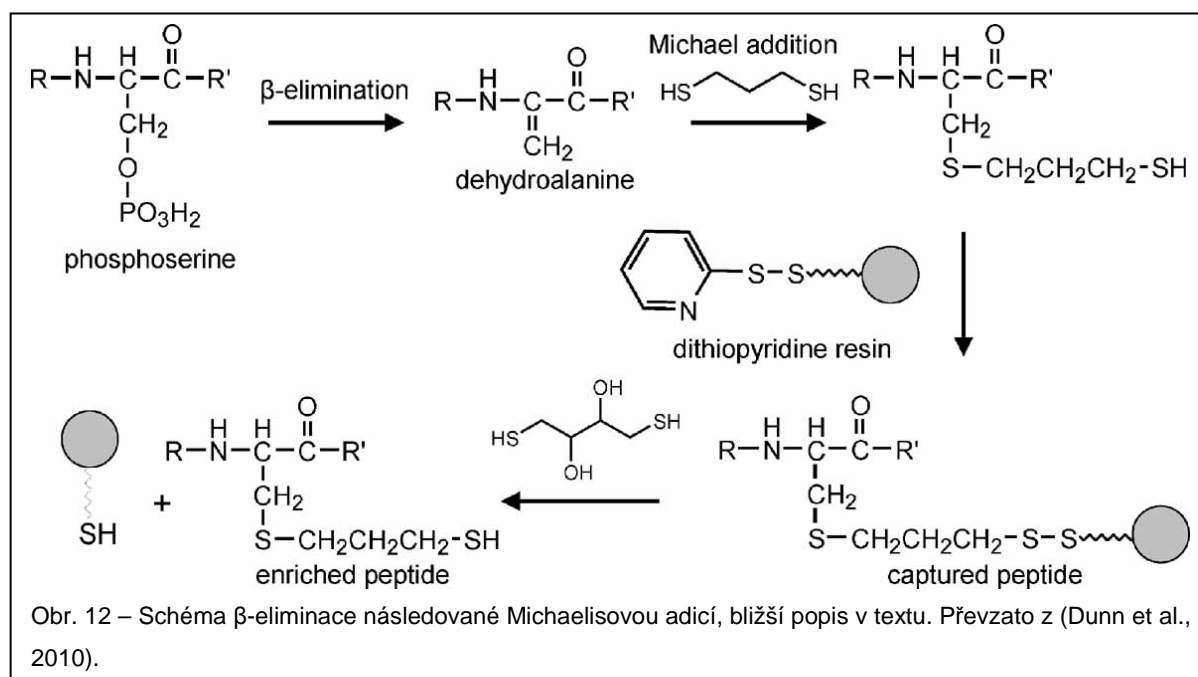
2.2.7. Chemické modifikace

Metod chemické modifikace fosfopeptidů existuje více, pro ilustraci uvedu jen metodu jedinou, β -eliminaci následovanou Michaelisovou adicí (Thaler et al., 2003). Další modifikační metody jsou k nalezení například v recentním přehledném článku (Dunn et al., 2010).

Nejprve se oxiduje cystein pomocí kyseliny peroxymravenčí. Cystein musí být zablokován, protože by se mohl svou thiolovou skupinou v závěrečných krocích metody vázat na nosič vedle modifikovaných fosfopeptidů. Po zablokování cysteinu dojde působením hydroxidu sodného nebo barnatého k β -eliminaci fosfátu a z fosfoserinu a fosfothreoninu vznikne dehydroalanin resp. kys. dehydroaminomáselná (viz Obr. 12). Nově vzniklá dvojná vazba na postranním řetězci aminokyseliny umožňuje adici. Konkrétně se k této reakci využívá propandithiol, čímž na zasažených aminokyselinách vznikne postranní skupina s koncovou thiolovou skupinou, jíž se dá využít pro navázání modifikovaného peptidu na dithiopyridinový resin. Na tento resin se vychytají jen modifikované fosfopeptidy (cystein je zablokován), jež lze posléze uvolnit redukcí pomocí DTT nebo 2-merkптоethanolu.

Jednou z dalších alternativ k vychytávání modifikovaných fosfopeptidů po β -eliminaci je navázání biotinového tagu na modifikované peptidy a jejich následné vychytávání pomocí avidinu (Oda et al., 2001).

Nevýhodou β -eliminace je nemožnost její aplikace na fosfotyrosin, neboť ten β -eliminaci nepodléhá (některé jiné metody chemické modifikace fosfotyrosin přeměnit umí). β -eliminaci podléhají nejen fosfoserin a fosfothreonin, ale i O-glykosylované formy těchto



aminokyselin, a tak se nedá odlišit, byl-li protein původně glykosylován nebo fosforylován. Další nevýhodou jsou ztráty materiálu a neúplný průběh reakce, který může zvyšovat komplexitu vzorku.

3. Závěr

Tato bakalářská práce popisuje různé možnosti, jak obohatit vzorek o fosfoproteiny nebo fosfopeptidy. Oba z těchto přístupů mají své výhody i nevýhody. Obohacování celých fosfoproteinů umožňuje jejich dělení na dvojrozměrné elektroforéze, a tak zjištění jejich izoelektrického bodu a molekulární hmotnosti. Na stranu druhou hrozí nezachycení extrémně malých, lipofilních, kyselých a zásaditých proteinů. Obohacování o fosfopeptidy umožňuje obohacovat i o tyto extrémní fosfopeptidy. Výhodou je také menší komplexita získaných peptidů v porovnání s intaktními proteiny. Přesto se fosfopeptidové metody mnohdy potýkají s nedostatečnou selektivitou a senzitivitou. Navíc se nemusí peptid podařit identifikovat, protože identifikace se nemůže opřít o další peptidy daného proteinu. Ve směsi bez předem označených proteinů totiž nelze určit, ke kterému proteinu peptid patří.

Ze zmíněných metod nelze vybrat jednu jedinou, která by nejlépe splňovala požadavky fosfoproteomických výzkumů. Popsané metody lze tedy považovat daleko spíše za plnohodnotné alternativy než na prezentaci žebříčku od nejlepších po nejhorší.

Navíc v mnohých výzkumech bylo dokázáno, že více použitých metod vede k širšímu spektru identifikovaných fosfoproteinů. To je způsobeno skutečností, že každá z metod napomáhá odhalit určitou část fosfoproteomu s větší efektivitou než metoda jiná. Teprve jejich kombinací tak dospějeme k celkovému obrazu o fosfoproteomu (Bodenmiller et al., 2007; Ito et al., 2009).

Mnohé metody, případně jejich inovace, se stále potýkají s nedostatkem experimentálních dat nebo s neověřením na komplexním vzorku. Výborná funkčnost metody při obohacování standardních proteinů totiž nezaručuje stejnou efektivitu při obohacování fosforylovaných proteinů nebo peptidů z komplexních biologických vzorků. Dalším problémem bývá protichůdnost výsledků získaných při zavedení stejné inovace v protokolu ve více laboratořích. Mnohé protokoly tak ještě zdaleka nejsou plně zdokonalené a jejich další optimalizace jsou mimo jiné předmětem výzkumu. Navíc zlepšení obohacovacích protokolů jsou doprovázena nutnými optimalizacemi hmotnostní spektrometrie, které nebyly předmětem této bakalářské práce.

Přes mnohé komplikace se dá říci, že za posledních pět let prodělala fosfoproteomika se svými obohacovacími protokoly značný pokrok a bylo publikováno mnoho prací popisujících úspěšně identifikované fosfoproteiny. Přesto tento pokrok není dosažením vrcholu a zbývá mnoho práce s optimalizací protokolů.

4. Použité zkratky

DHB... kyselina 2,5-dihydroxybenzoová

DTT... dithiothreitol

ESI MS... hmotnostní spektrometrie s využitím elektrosprejové ionizace (angl. electrospray ionization mass spectrometry)

HILIC... kapalinová chromatografie dělicí podle hydrofilicity (angl. hydrophilic interaction liquid chromatography)

IDA... kys. iminodioctová (angl. iminodiacetic acid)

IEF-PAGE... dvojrozměrná gelová elektroforéza (angl. isoelectric focusing – polyacrylamide gel electrophoresis)

IMAC... chelatační afinitní chromatografie (angl. immobilized metal affinity chromatography)

LC... kapalinová chromatografie (angl. liquid chromatography)

μLC-ICP-MS... kapilární kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (angl. capillary liquid chromatography – inductively coupled plasma – mass spectrometry)

MALDI MS... hmotnostní spektrometrie s využitím laserové ionizace (angl. matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry)

MES... kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová

MOAC... afinitní chromatografie s využitím kovového oxidu (angl. metal oxid affinity chromatography)

MS... hmotnostní spektrometrie (angl. mass spectrometry)

NTA... kyselina nitrilotrioctová (angl. nitrilotriacetic acid)

pS... fosfoserin

pT... fosfothreonin

pY... fosfotyrosin

SAX... aniontová iontoměničová chromatografie (angl. strong anion exchange chromatography)

SCX... kationtová iontoměničová chromatografie (angl. strong cation exchange chromatography)

SDS-PAGE... jednorozměrná gelová elektroforéza (angl. sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis)

SDS... sodium dodecyl sulfát

SIMAC... IMAC s postupným uvolňováním zachycených peptidů (angl. sequential elution from IMAC)

TFA... kyselina trifluorooctová (angl. trifluoroacetic acid)

5. Literatura

- Aryal UK, Ross ARS** (2010) Enrichment and analysis of phosphopeptides under different experimental conditions using titanium dioxide affinity chromatography and mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **24**: 219-231
- Augustine RC, Vidali L, Kleinman KP, Bezanilla M** (2008) Actin depolymerizing factor is essential for viability in plants, and its phosphoregulation is important for tip growth. *Plant Journal* **54**: 863-875
- Ballesta JPG, Rodriguez-Gabriel MA, Bou G, Briones E, Zambrano R, Remacha M** (1999) Phosphorylation of the yeast ribosomal stalk. Functional effects and enzymes involved in the process. *Fems Microbiology Reviews* **23**: 537-550
- Barbieri CM, Stock AM** (2008) Universally applicable methods for monitoring response regulator aspartate phosphorylation both in vitro and in vivo using Phos-tag-based reagents. *Analytical Biochemistry* **376**: 73-82
- Barnouin KN, Hart SR, Thompson AJ, Okuyama M, Waterfield M, Cramer R** (2005) Enhanced phosphopeptide isolation by Fe(III)-IMAC using 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol. *Proteomics* **5**: 4376-4388
- Baskaran R, Chiang GG, Mysliwiec T, Kruh GD, Wang JYJ** (1997) Tyrosine phosphorylation of RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by the Abl-related gene product. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 18905-18909
- Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villen J, Li JX, Cohn MA, Cantley LC, Gygi SP** (2004) Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 12130-12135
- Besant PG, Attwood PV** (2009) Detection and analysis of protein histidine phosphorylation. *Molecular and Cellular Biochemistry* **329**: 93-106
- Besant PG, Attwood PV, Piggott MJ** (2009) Focus on Phosphoarginine and Phospholysine. *Current Protein & Peptide Science* **10**: 536-550
- Birck C, Mourey L, Gouet P, Fabry B, Schumacher J, Rousseau P, Kahn D, Samama JP** (1999) Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain. *Structure* **7**: 1505-1515
- Bodenmiller B, Mueller LN, Mueller M, Domon B, Aebersold R** (2007) Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome. *Nature Methods* **4**: 231-237
- Cantin GT, Shock TR, Park SK, Madhani HD, Yates JR** (2007) Optimizing TiO₂-based phosphopeptide enrichment for automated multidimensional liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **79**: 4666-4673
- Chen CT, Chen YC** (2005) Fe₃O₄/TiO₂ core/shell nanoparticles as affinity probes for the analysis of phosphopeptides using TiO₂ surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **77**: 5912-5919
- Collins MO, Yu L, Coba MP, Husi H, Campuzano L, Blackstock WP, Choudhary JS, Grant SGN** (2005) Proteomic analysis of in vivo phosphorylated synaptic proteins. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 5972-5982
- Darewicz M, Dziuba J, Minkiewicz P** (2005) Some properties of beta-casein modified via phosphatase. *Acta Alimentaria* **34**: 403-415
- de Groot MJL, Daran-Lapujade P, van Breukelen B, Knijnenburg TA, de Hulster EAF, Reinders MJT, Pronk JT, Heck AJR, Slijper M** (2007) Quantitative proteomics and transcriptomics of anaerobic and aerobic yeast cultures reveals post-transcriptional regulation of key cellular processes. *Microbiology-Sgm* **153**: 3864-3878

- Dephoure N, Zhou C, Villen J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, Gygi SP** (2008) A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 10762-10767
- Dubrovskaja A, Souchelnytskyi S** (2005) Efficient enrichment of intact phosphorylated proteins by modified immobilized metal-affinity chromatography. *Proteomics* **5**: 4678-4683
- Duclos B, Marcandier S, Cozzone AJ** (1991) Chemical-properties and separation of phosphoamino acids by thin-layer chromatography and/or electrophoresis. *Methods in Enzymology* **201**: 10-21
- Dunn JD, Reid GE, Bruening ML** (2010) Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **29**: 29-54
- Ficarro SB, McClelland ML, Stukenberg PT, Burke DJ, Ross MM, Shabanowitz J, Hunt DF, White FM** (2002) Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnology* **20**: 301-305
- Fletterick RJ, Sprang SR** (1982) Glycogen-phosphorylase structures and function. *Accounts of Chemical Research* **15**: 361-369
- Gamble RL, Coonfield ML, Schaller GE** (1998) Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 7825-7829
- Garnak M, Reeves HC** (1979) Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science* **203**: 1111-1112
- Grønberg M, Kristiansen TZ, Stensballe A, Andersen JS, Ohara O, Mann M, Jensen ON, Pandey A** (2002) A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies - Identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate. *Molecular & Cellular Proteomics* **1**: 517-527
- Han GH, Ye ML, Zhou HJ, Jiang XN, Feng S, Jiang XG, Tian RJ, Wan DF, Zou HF, Gu JR** (2008) Large-scale phosphoproteome analysis of human liver tissue by enrichment and fractionation of phosphopeptides with strong anion exchange chromatography. *Proteomics* **8**: 1346-1361
- Hart SR, Waterfield MD, Burlingame AL, Cramer R** (2002) Factors governing the solubilization of phosphopeptides retained on ferric NTA IMAC beads and their analysis by MALDI TOFMS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **13**: 1042-1051
- Holmes-Davis R, Tanaka CK, Vensel WH, Hurkman WJ, McCormick S** (2005) Proteome mapping of mature pollen of *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* **5**: 4864-4884
- Hultquist DE** (1968) Preparation and characterization of phosphorylated derivatives of histidine. *Biochimica et Biophysica Acta* **153**: 329-340
- Imam-Sghiouar N, Joubert-Caron R, Caron M** (2005) Application of metal-chelate affinity chromatography to the study of the phosphoproteome. *Amino Acids* **28**: 105-109
- Imam-Sghiouar N, Laude-Lemaire I, Labas V, Pflieger D, Le Caer JP, Caron M, Nabias DK, Joubert-Caron R** (2002) Subproteomics analysis of phosphorylated proteins: Application to the study of B-lymphoblasts from a patient with Scott syndrome. *Proteomics* **2**: 828-838
- Imami K, Sugiyama N, Kyono Y, Tomita M, Ishirama Y** (2008) Automated phosphoproteome analysis for cultured cancer cells by two-dimensional nanoLC-MS using a calcined titania/C18 biphasic column. *Analytical Sciences* **24**: 161-166
- Imanishi SY, Kochin V, Eriksson JE** (2007) Optimization of phosphopeptide elution conditions in immobilized Fe(III) affinity chromatography. *Proteomics* **7**: 174-176

- Ito J, Taylor NL, Castleden I, Weckwerth W, Millar AH, Heazlewood JL** (2009) A survey of the *Arabidopsis thaliana* mitochondrial phosphoproteome. *Proteomics* **9**: 4229-4240
- Jensen SS, Larsen MR** (2007) Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**: 3635-3645
- Kim J, Shen Y, Han YJ, Park JE, Kirchenbauer D, Soh MS, Nagy F, Schafer E, Song PS** (2004) Phytochrome phosphorylation modulates light signaling by influencing the protein-protein interaction. *Plant Cell* **16**: 2629-2640
- Kinoshita E, Yamada A, Takeda H, Kinoshita-Kikuta E, Koike T** (2005) Novel immobilized zinc(II) affinity chromatography for phosphopeptides and phosphorylated proteins. *Journal of Separation Science* **28**: 155-162
- Kinoshita-Kikuta E, Kinoshita E, Yamada A, Endo M, Koike T** (2006) Enrichment of phosphorylated proteins from cell lysate using a novel phosphate-affinity chromatography at physiological pH. *Proteomics* **6**: 5088-5095
- Kokubu M, Ishihama Y, Sato T, Nagasu T, Oda Y** (2005) Specificity of immobilized metal affinity-based IMAC/C18 tip enrichment of phosphopeptides for protein phosphorylation analysis. *Analytical Chemistry* **77**: 5144-5154
- Kowluru A, Seavey SE, Rhodes CJ, Metz SA** (1996) A novel regulatory mechanism for trimeric GTP-binding proteins in the membrane and secretory granule fractions of human and rodent β cells. *Biochemical Journal* **313**: 97-107
- Krüger R, Wolschin F, Weckwerth W, Bettmer J, Lehmann WD** (2007) Plant protein phosphorylation monitored by capillary liquid chromatography-element mass spectrometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **355**: 89-96
- Kweon HK, Hakansson K** (2006) Selective zirconium dioxide-based enrichment of phosphorylated peptides for mass spectrometric analysis. *Analytical Chemistry* **78**: 1743-1749
- Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON, Roepstorff P, Jorgensen TJD** (2005) Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Molecular & Cellular Proteomics* **4**: 873-886
- Leitner A** (2010) Phosphopeptide enrichment using metal oxide affinity chromatography. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **29**: 177-185
- Lemeer S, Pinkse MWH, Mohammed S, van Breukelen B, den Hertog J, Slijper M, Heck AJR** (2008) Online automated in vivo zebrafish phosphoproteomics: From large-scale analysis down to a single embryo. *Journal of Proteome Research* **7**: 1555-1564
- Lenman M, Sorensson C, Andreasson E** (2008) Enrichment of phosphoproteins and phosphopeptide derivatization identify universal stress proteins in elicitor-treated *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 1275-1284
- Li QR, Ning ZB, Tang JS, Nie S, Zeng R** (2009) Effect of peptide-to-TiO₂ beads ratio on phosphopeptide enrichment selectivity. *Journal of Proteome Research* **8**: 5375-5381
- Li YJ, Luo YM, Wu SZ, Gao YH, Liu YX, Zheng DX** (2009) Nucleic Acids in Protein Samples Interfere with Phosphopeptide Identification by Immobilized-Metal-Ion Affinity Chromatography and Mass Spectrometry. *Molecular Biotechnology* **43**: 59-66
- Lind SB, Molin M, Savitski MM, Emilsson L, Astrom J, Hedberg L, Adams C, Nielsen ML, Engstrom A, Elfineh L, Andersson E, Zubarev RA, Pettersson U** (2008) Immunoaffinity enrichments followed by mass spectrometric detection for studying global protein tyrosine phosphorylation. *Journal of Proteome Research* **7**: 2897-2910

- Macek B, Mijakovic I, Olsen JV, Gnad F, Kumar C, Jensen PR, Mann M** (2007) The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Molecular & Cellular Proteomics* **6**: 697-707
- Machida M, Kosako H, Shirakabe K, Kobayashi M, Ushiyama M, Inagawa J, Hirano J, Nakano T, Bando Y, Nishida E, Hattori S** (2007) Purification of phosphoproteins by immobilized metal affinity chromatography and its application to phosphoproteome analysis. *Febs Journal* **274**: 1576-1587
- Mamone G, Picariello G, Ferranti P, Addeo F** (2010) Hydroxyapatite affinity chromatography for the highly selective enrichment of mono- and multi-phosphorylated peptides in phosphoproteome analysis. *Proteomics* **10**: 380-393
- Mazanek M, Mituloviae G, Herzog F, Stingl C, Hutchins JRA, Peters JM, Mechtler K** (2007) Titanium dioxide as a chemo-affinity solid phase in offline phosphopeptide chromatography prior to HPLC-MS/MS analysis. *Nature Protocols* **2**: 1059-U1051
- Mazanek M, Roitinger E, Hudecz O, Hutchins JRA, Hegemann B, Mitulovic G, Taus T, Stingl C, Peters JM, Mechtler K** (2010) A new acid mix enhances phosphopeptide enrichment on titanium- and zirconium dioxide for mapping of phosphorylation sites on protein complexes. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **878**: 515-524
- McNulty DE, Annan RS** (2008) Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection. *Molecular & Cellular Proteomics* **7**: 971-980
- Mishra NS, Tuteja R, Tuteja N** (2006) Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **452**: 55-68
- Molina H, Horn DM, Tang N, Mathivanan S, Pandey A** (2007) Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 2199-2204
- Moll T, Tebb G, Surana U, Robitsch H, Nasmyth K** (1991) The role of phosphorylation and the CDC28 protein-kinase in cell-cycle regulated nuclear import of the *Saccharomyces-cerevisiae* transcription factor-SWI15. *Cell* **66**: 743-758
- Ndassa YM, Orsi C, Marto JA, Chen S, Ross MM** (2006) Improved immobilized metal affinity chromatography for large-scale phosphoproteomics applications. *Journal of Proteome Research* **5**: 2789-2799
- Neville DCA, Rozanas CR, Price EM, Gruis DB, Verkman AS, Townsend RR** (1997) Evidence for phosphorylation of serine 753 in CFTR using a novel metal-ion affinity resin and matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Protein Science* **6**: 2436-2445
- Nousiainen M, Sillje HHW, Sauer G, Nigg EA, Korner R** (2006) Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 5391-5396
- Novotna L, Hruby M, Benes MJ, Kucerova Z** (2008) Immobilized metal affinity chromatography of phosphorylated proteins using high performance sorbents. *Chromatographia* **68**: 381-386
- Nuhse TS, Stensballe A, Jensen ON, Peck SC** (2003) Large-scale analysis of in vivo phosphorylated membrane proteins by immobilized metal ion affinity chromatography and mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* **2**: 1234-1243
- Nuhse TS, Stensballe A, Jensen ON, Peck SC** (2004) Phosphoproteomics of the arabidopsis plasma membrane and a new phosphorylation site database. *Plant Cell* **16**: 2394-2405
- Oda Y, Nagasu T, Chait BT** (2001) Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. *Nature Biotechnology* **19**: 379-382

- Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M** (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**: 635-648
- Pandey A, Podtelejnikov AV, Blagoev B, Bustelo XR, Mann M, Lodish HF** (2000) Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: Identification of Vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 179-184
- Petrova OE, Sauer K** (2009) A Novel Signaling Network Essential for Regulating *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *Plos Pathogens* **5**: 16
- Pinkse MWH, Uitto PM, Hilhorst MJ, Ooms B, Heck AJR** (2004) Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-nanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns. *Analytical Chemistry* **76**: 3935-3943
- Posewitz MC, Tempst P** (1999) Immobilized gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides. *Analytical Chemistry* **71**: 2883-2892
- Rihs HP, Jans DA, Fan H, Peters R** (1991) The rate of nuclear cytoplasmic protein-transport is determined by the casein kinase-II site flanking the nuclear-localization sequence of the SV40 T-antigen. *Embo Journal* **10**: 633-639
- Röhrig H, Colby T, Schmidt J, Harzen A, Facchinelli F, Bartels D** (2008) Analysis of desiccation-induced candidate phosphoproteins from *Craterostigma plantagineum* isolated with a modified metal oxide affinity chromatography procedure. *Proteomics* **8**: 3548-3560
- Sale GJ, Towner P, Akhtar M** (1978) Topography of rhodopsin molecule - identification of domain phosphorylated. *Biochemical Journal* **175**: 421-430
- Seeley EH, Riggs LD, Regnier FE** (2005) Reduction of non-specific binding in Ga(III) immobilized metal affinity chromatography for phosphopeptides by using endoproteinase glu-C as the digestive enzyme. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **817**: 81-88
- Sheoran IS, Ross ARS, Olson DJH, Sawhney VK** (2009) Compatibility of plant protein extraction methods with mass spectrometry for proteome analysis. *Plant Science* **176**: 99-104
- Steinberg TH, Agnew BJ, Gee KR, Leung WY, Goodman T, Schulenberg B, Hendrickson J, Beechem JM, Haugland RP, Patton WF** (2003) Global quantitative phosphoprotein analysis using multiplexed proteomics technology. *Proteomics* **3**: 1128-1144
- Stensballe A, Jensen ON** (2004) Phosphoric acid enhances the performance of Fe(III) affinity chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry for recovery, detection and sequencing of phosphopeptides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **18**: 1721-1730
- Sugiyama N, Masuda T, Shinoda K, Nakamura A, Tomita M, Ishihama Y** (2007) Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. *Molecular & Cellular Proteomics* **6**: 1103-1109
- Sugiyama N, Nakagami H, Mochida K, Daudi A, Tomita M, Shirasu K, Ishihama Y** (2008) Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis*. *Molecular Systems Biology* **4**: 7
- Tan F, Zhang YJ, Wang JL, Wei JY, Cai Y, Qian XH** (2008) An efficient method for dephosphorylation of phosphopeptides by cerium oxide. *Journal of Mass Spectrometry* **43**: 628-632

- Thaler F, Valsasina B, Baldi R, Jin X, Stewart A, Isacchi A, Kalisz HM, Rusconi L** (2003) A new approach to phosphoserine and phosphothreonine analysis in peptides and proteins: chemical modification, enrichment via solid-phase reversible binding, and analysis by mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **376**: 366-373
- Thingholm TE, Jensen ON, Robinson PJ, Larsen MR** (2008) SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. *Molecular & Cellular Proteomics* **7**: 661-671
- Thingholm TE, Jorgensen TJD, Jensen ON, Larsen MR** (2006) Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nature Protocols* **1**: 1929-1935
- To JPC, Deruere J, Maxwell BB, Morris VF, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ** (2007) Cytokinin regulates type-A Arabidopsis response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell* **19**: 3901-3914
- Tsai CF, Wang YT, Chen YR, Lai CY, Lin PY, Pan KT, Chen JY, Khoo KH, Chen YJ** (2008) Immobilized metal affinity chromatography revisited: pH/Acid control toward high selectivity in phosphoproteomics. *Journal of Proteome Research* **7**: 4058-4069
- Wessel D, Flügge UI** (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute-solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry* **138**: 141-143
- Wolschin F, Lehmann U, Glinski M, Weckwerth W** (2005) An integrated strategy for identification and relative quantification of site-specific protein phosphorylation using liquid chromatography coupled to MS2/MS3. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19**: 3626-3632
- Wolschin F, Wienkoop S, Weckwerth W** (2005) Enrichment of phosphorylated proteins and peptides from complex mixtures using metal oxide/hydroxide affinity chromatography (MOAC). *Proteomics* **5**: 4389-4397
- Wu J, Shakey Q, Liu W, Schuller A, Follettie MT** (2007) Global profiling of phosphopeptides by titania affinity enrichment. *Journal of Proteome Research* **6**: 4684-4689
- Xia QW, Cheng DM, Duong DM, Gearing M, Lah JJ, Levey AI, Peng JM** (2008) Phosphoproteomic analysis of human brain by calcium phosphate precipitation and mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* **7**: 2845-2851
- Zhang GA, Neubert TA** (2006) Use of detergents to increase selectivity of immunoprecipitation of tyrosine phosphorylated peptides prior to identification by MALDI quadrupole-TOF MS. *Proteomics* **6**: 571-578
- Zhang X, Ye JY, Jensen ON, Roepstorff P** (2007) Highly efficient phosphopeptide enrichment by calcium phosphate precipitation combined with subsequent IMAC enrichment. *Molecular & Cellular Proteomics* **6**: 2032-2042
- Zhou HJ, Tian RJ, Ye ML, Xu SY, Feng S, Pan CS, Jiang XG, Li X, Zou HF** (2007) Highly specific enrichment of phosphopeptides by zirconium dioxide nanoparticles for phosphoproteome analysis. *Electrophoresis* **28**: 2201-2215