



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Analýza proteinových fosforylací
proteomickými metodami**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Ivan Petřík
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ivo Chamrád, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2013

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Ivan Petřík
Název práce	Analýza proteinových fosforylací proteomickými metodami
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Technologické centrum UP Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
Vedoucí práce	Mgr. Ivo Chamrád, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>V nedávné době bylo publikováno několik studií, které se zabývají obohacením fosforylovaných peptidů metodou afinitní chromatografie na oxidu titaničitém. Ukázalo se, že ke zvýšení selektivity a účinnosti této metody do značné míry přispívá použití slabých alifatických organických kyselin. Teoretická část této práce se věnuje obecným procesům posttranslační modifikace a fosforylace a popisuje historii a využití nejčastěji používaných metod analýzy fosforylací. Zaměřuje se především na selektivní obohacení fosforylovaných peptidů s využitím oxidu titaničitého. Experimentální část se zabývá ověřením vlivu vybraných organických kyselin na účinnost a selektivitu izolace fosforylovaných peptidů.</p>
Klíčová slova	Proteomika, posttranslační modifikace, fosforylace, afinitní chromatografie, oxid titaničitý
Počet stran	60
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's name	Ivan Petřík
Title of thesis	Analysis of protein phosphorylations using proteomics approach
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics Technological Centre of the Palacký University Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research
Supervisor	Mgr. Ivo Chamrád, Ph.D.
The year of presentation	2013

Abstract

Recently several studies focusing on selective phosphopeptide enrichment with the use of titanium dioxide affinity chromatography have been published. It has been shown, that some of small aliphatic organic acids possess the ability to improve the efficiency and selectivity of the method. Theoretical part of this bachelor thesis deals with posttranslational modifications, phosphorylation process and approaches currently used in phosphoproteomics. It summarizes the historical aspect and current progress in the most important selective phosphopeptide enrichment methods employing titanium dioxide. In the experimental part, the efficiency and selectivity of several titanium dioxide-based enrichment protocols are investigated.

Keywords	Proteomics, post-translational modifications, phosphorylation, affinity chromatography, titanium dioxide
Number of pages	60
Number of appendices	1
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 25. 7. 2013

Ivan Petřík

Poděkování

Na tomto místě chci poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Ivo Chamrádovi, Ph.D. za ochotný a přátelský přístup, cenné rady, věcné připomínky a odborné vedení při vypracovávání praktické části. Mé poděkování patří také Mgr. René Lenobelovi, Ph.D. za veškerou pomoc týkající se LC-MS/MS analýz a Mgr. Martinu Rausovi za poskytnutí skriptu pro hromadné zpracování dat v aplikaci *Protein Cutter*. Dále bych rád vyjádřil poděkování své rodině, přátelům a partnerce za trpělivost, podporu a lásku.

OBSAH

Cíle práce.....	8
1 Teoretická část.....	9
1.1 Proteomika.....	9
1.2 Posttranslační modifikace.....	10
1.3 Fosforylace.....	12
1.4 Proteomická analýza fosforylací.....	13
1.4.1 Imunoprecipitace.....	16
1.4.2 Chemické metody.....	16
1.4.3 IMAC.....	17
1.4.4 Oxid titaničitý.....	18
1.4.5 MS analýza fosforylací.....	22
2 Experimentální část.....	25
2.1 Použité chemikálie.....	25
2.2 Použité přístrojové vybavení.....	25
2.3 Použité nástroje a materiál.....	25
2.4 Použité roztoky.....	26
2.5 Metody.....	27
2.5.1 Příprava HeLa lyzátu.....	27
2.5.2 Izolace fosfopeptidů ve vsádkovém uspořádání.....	30
2.5.3 Izolace fosfopeptidů v kolonkovém uspořádání.....	31
2.5.4 Přečištění fosfopeptidů na C18 reverzní fázi.....	32
2.5.5 LC-MS/MS analýza.....	33
2.5.6 Zpracování dat.....	34
2.6 Výsledky a diskuze.....	36
2.6.1 Experimentální strategie.....	36
2.6.2 Přímé srovnání metod pro obohacování fosfopeptidů pomocí TiO ₂	38

Závěr.....	44
Seznam zkratek.....	46
Seznam použité literatury	48
Přílohy	61

CÍLE PRÁCE

Cíle této práce byly stanoveny takto:

- Vypracovat odbornou rešerši na téma proteinových fosforylací a proteomických metod vhodných k jejich výzkumu se zaměřením na metody izolace a prekoncentrace fosforylovaných peptidů.
- Experimentálně ověřit funkčnost a účinnost vybraných metod používaných pro izolaci a prekoncentraci fosforylovaných peptidů
- Na základě získaných výsledků vypracovat pracovní protokol použitelný pro rutinní separace fosforylovaných peptidů.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Proteomika

Proteomika je vědní obor, který se zabývá studiem exprese genetické informace na úrovni proteinů. Mapuje fenotypový projev genomu a navazuje tak na genomiku a transkriptomiku. Věnuje se analýze proteinů z hlediska jejich struktury, vzájemných interakcí, funkčních vztahů a také z hlediska jejich celkového množství. V současné době je proteomika jednou z nejprogresivnějších vědních disciplín (Jensen *et al.* 2006).

K rozvoji proteomiky přispěl příchod sofistikované technologie, která umožnila identifikaci proteinů a peptidů v komplexních biologických vzorcích s velmi vysokou citlivostí detekce dosahující až 10^{-15} mol (Mallick a Kuster 2010). Je to hmotnostní spektrometrie (MS), která může poskytovat užitečné informace o identitě, struktuře, regulaci a funkci proteinů, čímž se významnou měrou podílí na pochopení vztahů v biologických systémech (Walther a Mann 2010). Řada významných objevů v biologii či lékařské fyziologii byla učiněna právě s využitím MS.

V minulosti byla např. publikována série experimentů věnovaných funkci mitochondriálního proteinového komplexu, který se aktivně účastní apoptózy. S využitím elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a následné LC-MS/MS analýzy autoři zjistili, že komplex má strukturu heteropentameru (Harada *et al.* 1999). Překvapením bylo zjištění, že jeden z jeho podřízených proteinů je hexokinasa, která se svou glykolytickou aktivitou účastní degradace glukózy. Tento objev vedl k hypotéze, že apoptóza a glykolýza, dvě zdánlivě nesouvisející dráhy, sdílí společné enzymy (Danial *et al.* 2003).

MS přispěla také třeba k pochopení úlohy chaperonů při cystické fibróze. Bylo zjištěno, že chaperony napomáhají správnému sestavení chloridových kanálů CFTR v endoplasmatickém retikulu a jejich transportu do cytoplasmatické membrány (Riordan *et al.* 2005). Bodová mutace $\Delta F508$ na CFTR je pro cystickou fibrózu charakteristickou mutací, která brání přirozenému sestavení CFTR a vede k jeho degradaci (Loo *et al.* 1998). Aktivací specifických chaperonů z rodiny Hsp dochází ke správnému složení mutovaného kanálu a jeho transportu k membráně. S využitím imunoprecipitace a následné LC-MS/MS analýzy byla popsána interakce chaperonů s $\Delta F508$ -CFTR (Washburn *et al.* 2001).

Neville *et al.* se pak také zabýval chloridovým kanálem CFTR, a to konkrétně identifikací jeho proteinových fosforylací. Byl jedním z prvních, kdo k tomuto účelu použil před MS analýzou selektivní obohacení fosforylovaných peptidů pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaném iontu Fe^{3+} (Neville *et al.* 1997). Ukázalo se tak, že MS je jedním z možných nástrojů analýzy posttranslačních modifikací.

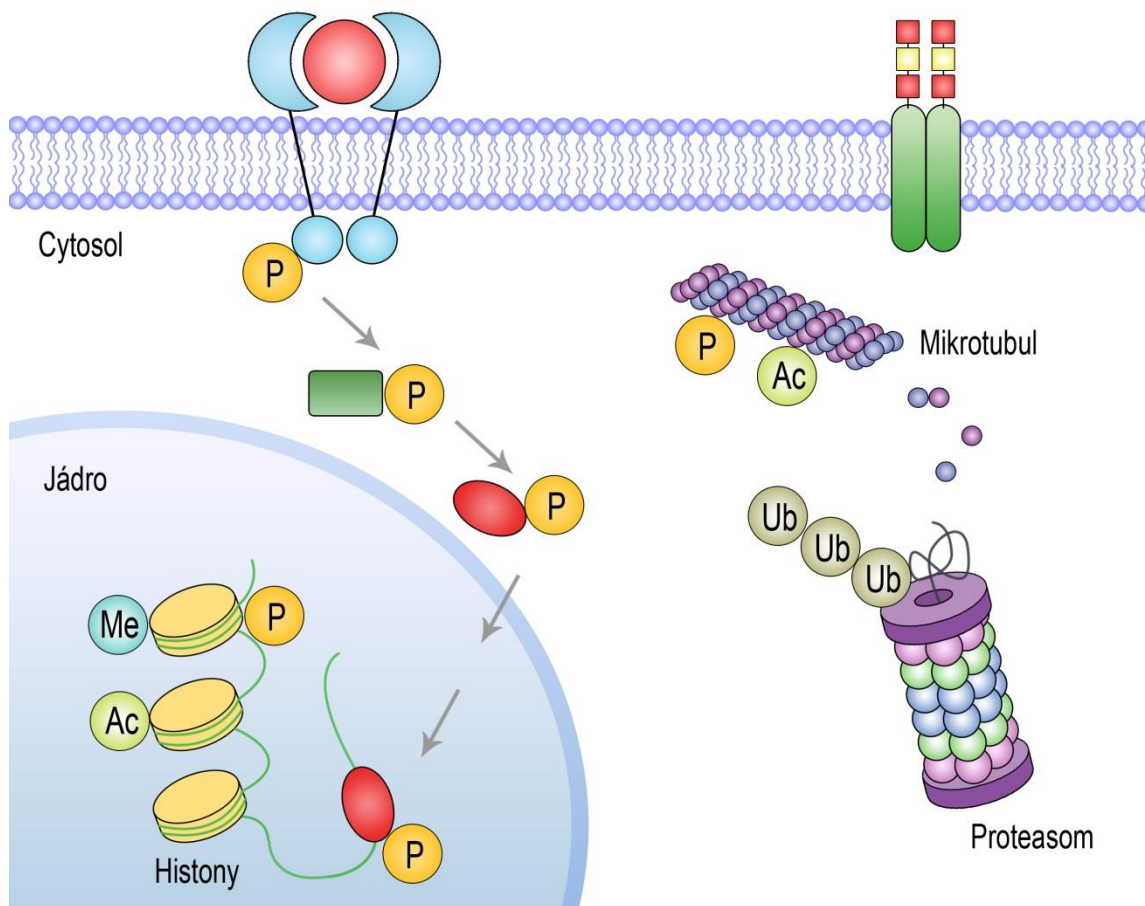
1.2 Posttranslační modifikace

Posttranslační modifikace jsou specifické změny ve struktuře proteinu, které jsou vyvolány kovalentní vazbou určitých funkčních skupin na definovaných místech primární struktury proteinu. MS je pak ideální technikou pro jejich determinaci a identifikaci, protože kovalentní vazba dané chemické skupiny k aminokyselině vede ke zvýšení její molekulové hmotnosti. Například fosforylace tyrozinu je při MS detekována jako nárůst jeho hmoty ze 163 Da na 243 Da, který je důsledkem připojení HPO_3 skupiny o hmotnosti 80 Da. MS tak umožňuje prošetřit fosforylační místa po celé délce intaktního proteinu nebo tryptického peptidu s rozlišením na úrovni aminokyselin. Vedle fosforylace lze dále zmínit např. acetylaci (+/-42 Da), deaminaci asparaginu na kyselinu asparagovou (+1 Da) nebo v případě intaktních proteinů detekci disulfidických můstků mezi cysteiny (-2 Da) (Jensen 2006).

Zatímco příslušné geny kódují aminokyselinovou sekvenci proteinu, posttranslační modifikace modulují např. jeho aktivitu a stabilitu v reálném čase. Je zřejmé, že tato schopnost dává posttranslačním modifikacím významné postavení v systémech buněčné regulace a signalizace u prokaryotických i eukaryotických organismů, a to z nich dělá jeden z nejatraktivnějších přístupů moderní proteomiky (Jensen 2006, Thingholm *et al.* 2009).

V minulosti bylo publikováno mnoho studií zabývajících se souvislostmi mezi jednotlivými typy posttranslačních modifikací a biologickou funkcí. Řada prací vycházela z předpokladu, že jedna modifikace konkrétní aminokyseliny je spojena s jednou biologickou funkcí. Dnes je však již známo, že biologické funkce jsou často regulovány přesnou souhrou více modifikací na více místech proteinu najednou. Výskyt určitého souboru posttranslačních modifikací na proteinu pak závisí na typu buňky, typu tkáně a okolních podmínkách. Příkladem jsou modifikace histonů, které modulují strukturu chromatinu. Významnými modifikacemi, které se prostřednictvím řady enzymů účastní tohoto procesu, jsou metylace, acetylace, fosforylace a ubikvitinylace.

Ty ovlivňují interakce histonových proteinů s DNA a řídí tak replikaci, transkripci nebo reparaci. Mimo to byly mnohonásobné posttranslační modifikace nalezeny také na nukleárních transkripčních faktorech, dále na strukturních proteinech cytoskeletu, receptorech v cytoplazmatické membráně nebo enzimech (Obrázek 1) (Fischle *et al.* 2003; Cosgrove *et al.* 2004).



Obrázek 1 Příklady posttranslačních modifikací. Fosforylace v signální dráze, glykosylace membránového proteinu, fosforylace a acetylace mikrotubulů, metylace histonů a ubikvitinylace proteinu určeného k degradaci. Adaptováno podle Jensen 2006.

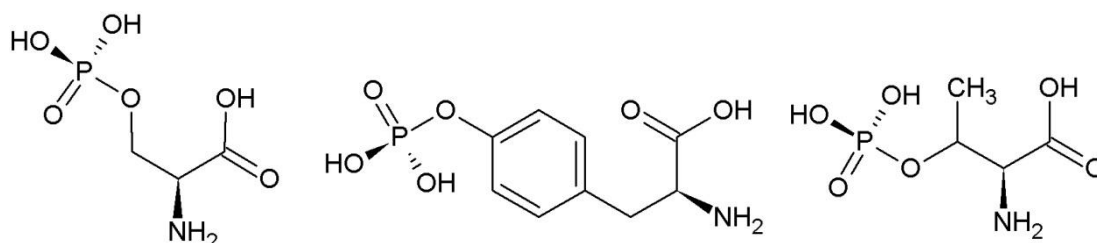
Skutečnost, že proteiny mohou nést celou řadu modifikací, také dramaticky zvyšuje rozmanitost a heterogenitu produktů genové exprese. Odhaduje se, že posttranslační modifikace spolu s mRNA sestřihem dávají v lidském genomu vznik stovkám tisíců produktů z odhadovaných 22500 otevřených čtecích rámců (Jensen 2006).

Dnes je známo více než 200 různých typů posttranslačních modifikací, které mohou být kovalentně vázány na kterýkoliv protein. Kromě výše jmenovaných se jedná

např. o glykosylace, sulfatace, farnesylace, oxidace, deaminace nebo hydroxylace. Z dostupných databází a statistik vyplývá, že k dnešnímu dni bylo dosud experimentálně odhaleno a potvrzeno celkem 221020 unikátních posttranslačně modifikovaných míst, z nichž téměř 70 % (153113 míst) připadá pouze fosforylacím (<http://dbptm.mbc.nctu.edu.tw/>).

1.3 Fosforylace

Nejběžnějším a v současné době nejprostudovanějším typem proteinové posttranslační modifikace je fosforylace. Fosforylace představuje děj, při kterém dochází k reverzibilní adici zbytku kyseliny fosforečné na boční řetězce aminokyselin proteinu. Bylo zjištěno, že u eukaryot jsou fosforylace uskutečňovány především na aminokyselinách serinu, threoninu a tyrosinu (Obrázek 2). Kromě toho byly popsány fosforylace i na dalších aminokyselinách jakými jsou histidin, arginin, lysin, cystein, kyselina asparagová a glutamová (Eyrich *et al.* 2011).



Obrázek 2 Fosforylované aminokyseliny. Zleva fosfoserin, fosfotyrosin a fosfothreonin.

Kontrolu nad údržbou fosforylací vykonávají protein kinasy a fosfatasy. Kinasy svou enzymatickou činností umožňují adici zbytku kyseliny fosforečné na boční řetězce aminokyselin cílového proteinu z vysokoenergetických látek jako ATP nebo GTP. To vede k zásadním změnám konformace, čímž protein dočasně získá nové vlastnosti. Fosforylace tímto způsobem ovlivňují např. katalytickou aktivitu, protein-proteinové interakce nebo stabilitu modifikovaného proteinu. V návaznosti na kinasy pracují fosfatasy, které v procesu defosforylace hydrolyticky odštěpují fosfátovou skupinu od hydroxyly cílového proteinu (Thingholm *et al.* 2009).

Jak vyplývá z předchozího odstavce, fosforylace je reverzibilním dějem, který vlivem přesné souhry kinas a fosfatas udržuje dynamiku živé buňky. Je klíčovou

složkou signálních drah a v mnoha případech zprostředkovává přenos signálu v reakci na podnět z vnějšího nebo vnitřního prostředí. Aktivace jedné kinasy totiž může za krátký čas vyvolat fosforylaci mnoha proteinů v signální dráze, čímž je signál velmi rychle převeden a zesílen (Graves *et al.* 1999). Proteinové fosforylace tak hrají nezbytnou úlohu v regulaci metabolismu a genové exprese, čímž ovlivňují takové biologické procesy, jakými jsou např. proliferace, diferenciace nebo apoptosa (Blume-Jensen *et al.* 2007). Poruchy fosforylací pak mohou vyvolat řadu onemocnění. Mohou vést k diabetes, chronickým zánětům, dědičným onemocněním, neurodegenerativním změnám jako je Alzheimerova choroba (Zhu *et al.* 2002) nebo ke vzniku a rozvoji rakoviny (Clevenger *et al.* 2004).

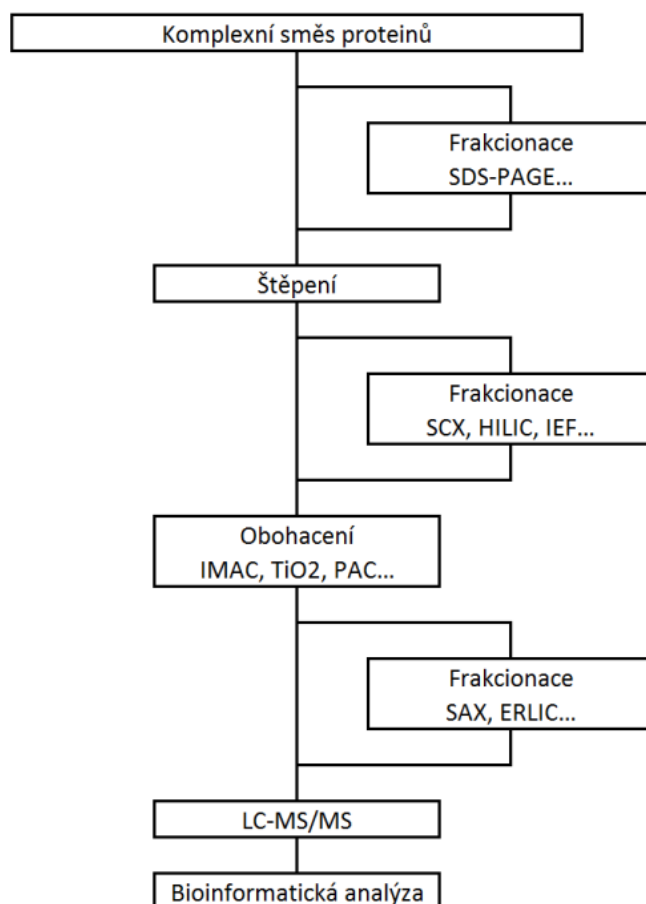
Je zřejmé, že výše zmíněné skutečnosti jsou důvodem toho, že v současné době je analýze fosforylací věnována zvýšená pozornost.

1.4 Proteomická analýza fosforylací

V minulosti byly k identifikaci fosfoproteinů/fosfopeptidů používány metody založené na značení radioaktivním izotopem ^{32}P nebo ^{33}P (MacDonald *et al.* 2002; Bendt *et al.* 2003). Často používanými metodami byly také Edmanovo odbourávání, kapilární elektroforéza nebo dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (Roepstorff *et al.* 1974). V dnešní době se analýza fosforylací opírá především o metody analýzy založené na MS. I přesto, že využívá této velmi sofistikované technologie, setkává se moderní fosfoproteomika s řadou problémů.

Studie odhadují, že více než polovina všech vytvořených proteinů je během života vystavena procesu fosforylace. Navzdory tomu, že jsou proteinové fosforylace nejrozšířenější posttranslační modifikací, hladiny fosforylovaných proteinů v buňce jsou udržovány ve velmi nízkých koncentracích. Dále je také známo, že proces fosforylace neprobíhá stochiometricky. Ve skutečnosti to znamená, že v jednom čase je modifikována pouze určitá část populace daného proteinu. To představuje velký problém pro proteomickou analýzu, protože signály fosfoproteinů/fosfopeptidů jsou při MS analýze často zastíněny signály ostatních (nefosforylovaných) proteinů/peptidů. Nezbytným krokem před MS analýzou se proto stala prekoncentrace fosfoproteinů/fosfopeptidů, při níž je z komplexního proteomu buněčného lyzátu izolována menšinová fosforylovaná část. To vede ke zlepšení citlivosti a účinnosti MS analýzy (Jensen 2006).

Proteomická analýza fosforylací se skládá z několika kroků. Její nedílnou součástí je vždy proteolytické štěpení směsi proteinů na směs peptidů, ze které jsou extrahovány fosfopeptidy a ty jsou analyzovány pomocí LC-MS/MS. Tento přístup může zahrnovat také frakcionační kroky na různých úrovních (Obrázek 3) (Engholm-Keller *et al.* 2011).



Obrázek 3 Schéma analýzy fosforylovaných peptidů.

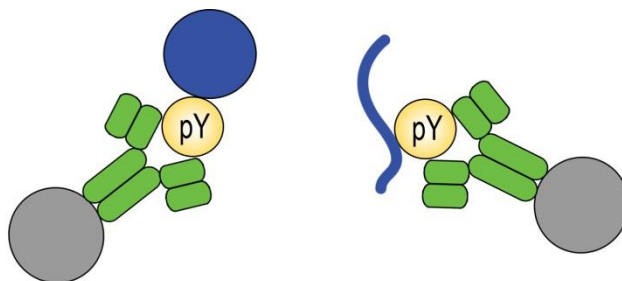
Např. SDS-PAGE a některé chromatografické metody jsou používány k frakcionaci komplexní směsi proteinů ještě před jejich štěpením (Tsai *et al.* 2008; Engholm-Keller *et al.* 2011). V řadě studií bylo popsáno několik metod vhodných k frakcionaci fosfopeptidů před jejich obohacením. Lze zmínit například izoelektrickou fokusaci (IEF) (Macarrone *et al.* 2006), iontově výměnnou chromatografii na silném katexu (SCX) (Ballif *et al.* 2004) a silném anexu (SAX) (Han *et al.* 2008), kapalinovou chromatografii s hydrofilní interakcí (HILIC) (McNulty *et al.* 2008) či její variantu s elektrostatickou repulzí (ERLIC) (Alpert *et al.* 2008). Tyto metody mohou být použity

také k frakcionaci již obohacených fosfopeptidů před samotnou LC-MS/MS analýzou (Engholm-Keller *et al.* 2011).

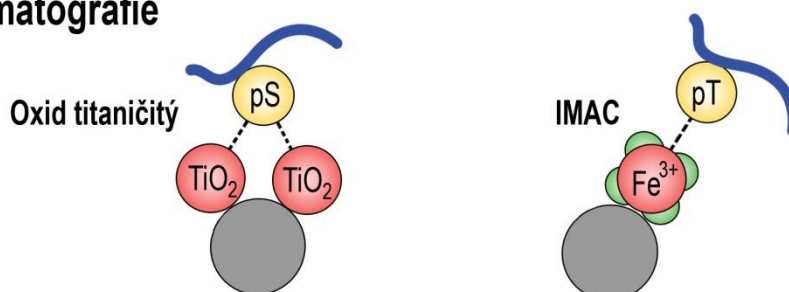
Na tomto místě je nutné říci, že nedílnou součástí analýzy proteinových fosforylací je také bioinformatické zpracování dat. To však představuje velmi rozsáhlé téma (Deutsch *et al.* 2008), které není předmětem této práce, a proto mu zde není věnována další pozornost.

Pro selektivní obohacení ať už frakcionovaných, nebo nefrakcionovaných fosfopeptidů, bylo v nedávné době úspěšně zavedeno několik metod. Mezi nejčastěji používané se dnes řadí imunoprecipitace (Rush *et al.* 2005), chemické metody (McLachlin a Chait 2003; Bodenmiller *et al.* 2007) a metody založené na afinitní chromatografii (Larsen *et al.* 2005; Jensen a Larsen 2007).

Imunoprecipitace



Afinitní chromatografie



Chemická derivatizace



Obrázek 4 Metody selektivního obohacení fosfopeptidů. Adaptováno podle Thingholm *et al.* 2009.

1.4.1 Imunoprecipitace

Jednotlivé fosfoproteiny a fosfopeptidy mohou být z buněčného lyzátu izolovány pomocí protilátek. V minulosti byly takto použity protilátky proti fosfoserinu, fosfothreoninu i fosfotyrozinu. Vysoce selektivní se ukázaly být protilátky proti fosforylovanému tyrozinu. Přestože je fosfotyrozin v přírodě zastoupen nejméně (Hunter *et al.* 1980), jeho separace byla úspěšně provedena hned několikrát. Steen *et al.* využil tuto metodu ke studiu receptoru epidermálního růstového faktoru a popsal jeho úlohu v signální dráze (Steen *et al.* 2002). Rush *et al.* použil protilátky proti fosfotyrozinu k obohacení tryptických peptidů a identifikoval tak 185 fosforylačních míst na tyrozinu v buněčné linii *Jurkat* (Rush *et al.* 2005). Stejně postupoval také Villén *et al.*, který popsal 385 fosforylačních míst na buňkách myších jater. Ve svých experimentech pracoval s 80 mg proteinů, tedy množstvím, které je v buněčných a tkáňových kulturách relativně obtížně dostupné (Villén *et al.* 2007). To dokládá, že je tato metoda náročná na množství vstupního materiálu. V některých pracích byly použity také protilátky proti fosfoserinu a fosfothreoninu. Ty však byly limitovány nízkou selektivitou a tak nejsou ve fosfoproteomice běžně používány (Grønborg *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2002).

1.4.2 Chemické metody

Některé přístupy obohacení fosfopeptidů byly vyvinuty na základě chemické derivatizace. Jednou z možných metod je β -eliminace fosfoserinu a fosfothreoninu následovaná Michaelovou adicí. V zásaditých podmínkách je ze serinu a threoninu odstraněna fosfokupina za vzniku dehydroalaninu, resp. β -methyldehydroalaninu. Ty jsou poté modifikovány volnou sulfhydrylovou skupinou, která může sloužit buď přímo k afinitní purifikaci (McLachlin a Chait 2003) nebo nepřímo k navázání biotinové značky a následné purifikaci pomocí avidinu (Oda *et al.* 2001). Knight *et al.* použil β -eliminaci v kombinaci s proteolytickým štěpením, kde fosfoserin a fosfothreonin modifikoval na aminoethylcystein a β -methylaminoethylcystein, na které potom zacílil specifické proteasy. Vzniklé peptidové fragmenty s fosforylačními místy byly identifikovány tandemovou hmotnostní spektrometrií (Knight *et al.* 2003). Nevýhodou této metody je skutečnost, že není citlivá k fosforylaci tyrozinu, protože fosfotyrozin nepodléhá β -eliminaci, a že interaguje s jinými modifikacemi, které β -eliminaci

podléhají (např. glykosylace). β -eliminací je tedy možné obohatit fosfopeptidy obsahující fosfoserin a fosfothreonin, ovšem pouze za předpokladu, že tyto aminokyseliny nejsou v peptidovém řetězci následovány prolinem (McLachlin a Chait 2003, Collins *et al.* 2007).

Jiným přístupem chemické derivatizace je fosforamidátová chemická metoda (PAC). Tento vícestupňový proces je založen na kondenzaci cystaminu s fosforylovými skupinami peptidů, které po redukci interagují s iodacetylovými skupinami imobilizovanými na polymerních částicích (Tao *et al.* 2005) nebo skleněných kuličkách (Bodenmiller *et al.* 2007). Fosfopeptidy jsou poté eluovány za kyselých podmínek. Aby bylo zabráněno nežádoucím interakcím s karboxylovými skupinami nefosforylovaných peptidů, musí kondenzaci předcházet krok methylesterifikace (Zhou *et al.* 2001). PAC má tu výhodu, že v jejím průběhu nedochází k odštěpení fosforylové skupiny od peptidu, což usnadňuje identifikaci fosforylačního místa pomocí LC-MS/MS. Na druhou stranu je omezena výraznými ztrátami, protože zahrnuje mnoho reakčních kroků (Bodenmiller *et al.* 2007).

1.4.3 IMAC

Značného pokroku dosáhly v posledních několika letech metody založené na afinitní chromatografii. Jednou z nejvýznamnějších se stala afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů (IMAC). IMAC byla poprvé použita při purifikaci proteinů interakcí s histidinovými a cysteinovými postranními řetězci (Andersson a Porah 1986). Klíčovou roli zde hrají kovové ionty chelatované kyselinou nitrilotrioctovou případně iminodioctovou imobilizovanou na pevné fázi, na nichž se zachycuje cílová funkční skupina analytu obsaženého ve fázi mobilní. Síla vazby a účinnost purifikace je dána typem funkční skupiny a použitým kovem. Např. Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} a Co^{2+} vykazují vysokou afinitu vzhledem ke skupinám obsahující dusík, zatímco ionty Fe^{3+} , Ga^{2+} , Al^{3+} a Ca^{2+} se ukázaly být vhodnými sorbenty pro izolaci skupin obsahující kyslík jako např. fosfát. Tím se IMAC otevírá možnost uplatnění v purifikaci fosforylovaných proteinů nebo častěji peptidů (Gaberc-Porekar a Menart 2001).

V proteomice našel využití zejména imobilizovaný iont Fe^{3+} , který byl použit jak při obohacení fosfoproteinů, tak fosfopeptidů získaných proteolytickým štěpením. Mezi prvními, kdo využili IMAC s Fe^{3+} kationtem, byli v roce 1997 Neville

a spolupracovníci, kteří jej aplikovali při obohacení fosfopeptidů pocházejících z proteinu CFTR (Neville *et al.* 1997). Význam Fe^{3+} byl později prokázán také v dalších pracích (Anguenot *et al.* 1999; Stensbale *et al.* 2004). V poslední době se ukázalo být vysoce účinné také použití iontů Zr^{4+} a Ti^{4+} . Zhou *et al.* provedl srovnání účinnosti obohacení fosfopeptidů bovinního sérového albuminu (BSA) a buněk myších jater s využitím Fe^{3+} , Zr^{4+} a Ti^{4+} a došel k závěru, že nejlepšími výsledky dosahuje Ti^{4+} (Zhou *et al.* 2008). Další úspěch Ti^{4+} přinesli Lai *et al.*, kteří použili Ti^{4+} k obohacení fosfopeptidů odvozených od fosfoproteinů buněk linie *Raji*. V této práci dosáhli relativně vysoké 88% selektivity (Lai *et al.* 2012). Vysoká selektivita byla prokázána také při obohacení fosfopeptidů z α -kaseinu a β -kaseinu s použitím Ti^{4+} imobilizovaném na disperzních částicích. (Zhou *et al.* 2013).

Velké úskalí, kterému metoda IMAC čelí, je nespecifická vazba nefosforylovaných peptidů. Interference vznikají nejčastěji u peptidů obsahující záporně nabitě nemodifikované aminokyseliny s karboxylovou skupinou v postranním řetězci. Tím se snižuje selektivita a účinnost purifikace. Jako řešení tohoto problému byla navržena metylace karboxylových skupin (Ficarro *et al.* 2002). Experimenty však ukázaly, že samotná metylace může způsobovat deaminaci glutaminu za vzniku kyseliny glutamové, resp. asparaginu za vzniku kyseliny asparagové (Seward *et al.* 2004; Trinidad *et al.* 2006). Tím se značně komplikuje průběh purifikace. Podmínkou metylace je navíc lyofilizace vzorku, při níž dochází k významným ztrátám fosfopeptidů (Speicher *et al.* 2000; Stewart *et al.* 2001). Alternativním přístupem zvýšení selektivity se ukázala být úprava pH podobně, jako je tomu u iontové výměnné chromatografie. Jak představil Kokubu *et al.*, zvolením vhodných reakčních podmínek, především složení pufrů, může být dosaženo vysoké selektivity a efektivity purifikace (Kokubu *et al.* 2005). Teoretické výpočty ukázaly, že omezení ionizace karboxylových skupin je dosaženo zvýšením koncentrace organického rozpouštědla acetonitrilu (ACN) a dále také okyselením vzorku organickou kyselinou, např. kyselinou trifluoroctovou (TFA), kdy dochází k protonizaci karboxylových skupin, čímž je omezena nespecifická vazba (Ye *et al.* 2010).

1.4.4 Oxid titaničitý

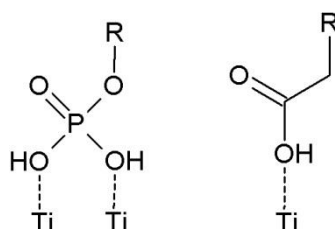
Další významnou metodou selektivního obohacení fosforylovaných peptidů se ukázala být afinitní chromatografie na oxidu titaničitém. Jedná se o metodu, která spadá

do skupiny analytických metod založených na afinitní chromatografii na oxidech kovů (MOAC) a ve fosfoproteomice patří mezi nejpoužívanější. Metoda se spoléhá na interakci mezi fosforylovou skupinou a oxidem titaničitým, přičemž rozhodujícím faktorem je afinita kyslíku fosforylové skupiny k atomu titanu (Aryal a Ross 2010). Na tomto místě je nutné také zmínit, že kromě izolace fosfopeptidů se oxid titaničitý stal také vhodným sorbentem pro izolaci řady dalších biomolekul. Jednou z jeho prvních aplikací byla separace ribonukleotidů a deoxyribonukleotidů ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) (Kawahara *et al.* 1989). Byl také úspěšně použit v separaci organického fosfátu od organického sulfátu a kyselých karboxylovaných složek (Matsuda *et al.* 1990) nebo v separaci nukleosid mono-, di- a trifosfátů při studiu aktivity ATPas (Kimura *et al.* 2004). Využití našel také v izolaci fosfolipidů (Calvano *et al.* 2009) a nedávno glykopeptidů (Lowe 2001) nebo peptidů modifikovaných N-acetylglukosaminem (Graham *et al.* 2011).

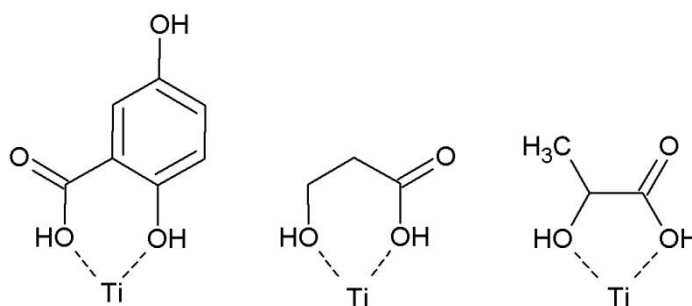
Milníkem z hlediska fosfoproteomiky se stalo využití oxidu titaničitého v selektivním obohacení fosforylovaných aminokyselin (Ikeguchi *et al.* 1997). V této práci byl oxid titaničitý použit v kombinaci s SCX a spektrofotometrickou detekcí. Jednalo se o vůbec první studii, která představila možnost separace fosforylovaných aminokyselin a peptidů od jejich nefosforylovaných protějšků. O několik let později publikovali Kuroda *et al.* a Pinkse *et al.* nezávisle na sobě studie, ve kterých k analýze fosfopeptidů použili uspořádání 2D-LC-MS/MS. Metoda se spoléhala na tandemovou hmotnostní spektrometrii, které předcházela postupná separace peptidů na oxidu titaničitém a reverzní fázi. Směs peptidů byla nanášena v kyselém pufru na oxid titaničitý. Poté byly fosfopeptidy eluovány dihydrogenfosforečnanem draselným a hydrogenuhlíčanem amonným, separovány na analytické koloně naplněné nosičem na bázi C18 a pomocí ESI iontového zdroje nastříkovány přímo do hmotnostního spektrometru, kde probíhala jejich MS analýza. Metoda se však podobně jako v případě IMAC setkávala s nespecifickou vazbou záporně nabitých nefosforylovaných peptidů (Kuroda *et al.* 2004; Pinkse *et al.* 2004). Ukázalo se, že tento nežádoucí jev znamená pro fosfoproteomiku skutečně velkou výzvu a řada prací se jím zabývá dodnes.

Ke zvýšení selektivity přispěl významnou měrou Larsen *et al.*, který ve své práci navrhl přidání kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové (DHB) do kyselého pufru, v němž byly peptidy nanášeny na off-line mikrokolonu s oxidem titaničitém (Larsen *et al.* 2005). Tato modifikace vedla k výraznému poklesu vazby nefosforylovaných peptidů, čímž se dramaticky zvýšila selektivita purifikace. Mechanismus účinku je založen na dvou

jevech. Jednak dochází vlivem velmi nízkého pH pufru k protonizaci karboxylových skupin a tím pádem k neutralizaci nefosforylovaných peptidů, které by jinak byly záporně nabitý. Fosfokupiny si naproti tomu vzhledem k jejich nízké disociační konstantě zachovávají negativní náboj. Druhým a významnějším jevem je vazebná interakce mezi DHB a oxidem titaničitým, resp. atomem titanu. DHB má podobný vazebný mód jako karboxylové skupiny nefosforylovaných peptidů a kompetuje s nimi o vazebná místa na oxidu titaničitém (Obrázek 6). Naproti tomu fosforylované peptidy se k oxidu titaničitému vážou v odlišném módu (Obrázek 5) (Connor *et al.* 1999; Dobson *et al.* 2000). Podobný účinek, jako má DHB, byl prokázán také na kyselině ftalové a malých alifatických hydroxyl-substituovaných karboxylových kyselinách (Obrázek 6) (Tani *et al.* 1999).



Obrázek 5 Vazebný mód fosforylové skupiny fosfopeptidu a vazebný mód karboxylové kyseliny nefosforylovaného peptidu. Adaptováno podle Engholm-Keller a Larsen 2011.



Obrázek 6 Vazebný mód DHB, kyseliny glykolové a kyseliny mléčné, který imituje vazbu karboxylové skupiny nefosforylovaných peptidů s oxidem titaničitém. Adaptováno podle Engholm-Keller a Larsen 2011.

Prokázalo se však, že DHB stejně jako kyselina ftalová jsou vzhledem ke své hydrofobní aromatické povaze eluovány na reverzní fázi společně s peptidy a negativně pak ovlivňují LC-MS/MS analýzu (Engholm-Keller a Larsen 2011). DHB proto byla

postupem času nahrazena jinými, ve vodě lépe rozpustnými kyselinami jako je kyselina glykolová (Jensen a Larsen 2007) nebo kyselina glutamová (Wu *et al.* 2007). Aryal a Ross ve své práci srovnali DHB a kyselinu glykolovou a došli k překvapivému závěru, že obohacení peptidů nanášených v kyselém pufru bez přídavku aditiva vede ke stejnému výsledku jako obohacení s přídavkem kyseliny glykolové (Aryal a Ross 2010). Srovnání provedl také Sugiyama *et al.*, který sledoval účinnost izolace fosfopeptidů s přídavkem DHB, kyseliny glykolové, mléčné, jablečné, tartarové a β -hydroxypropanové. Zjistil, že nejlepších výsledků s ohledem na selektivitu a počet izolovaných fosfopeptidů na oxidu titaničitém dosahuje kyselina mléčná (Sugiyama *et al.* 2007). Úspěchu dosáhl také Mazanek *et al.*, který představil směs kyselin 1-oktansulfonové (OSA) a DHB (Mazanek *et al.* 2007). Stejní autoři později publikovali aktualizaci protokolu, ve které zmíněnou směs inovovali kyselinou heptafluoromáselnou (HFBA) (Mazanek *et al.* 2010). Z výsledků předložených prací je zřejmé, že doposud nebylo jednoznačně určeno, která z uvedených kyselin je jako aditivum nejvhodnější.

Afinitní chromatografie na oxidu titaničitém je běžně prováděna v off-line uspořádání a to ve vsádkovém nebo mikrokolonkovém provedení (Wilson-Grady *et al.* 2008; Delcourt *et al.* 2007; Molina *et al.* 2007; Baker *et al.* 2009; Engholm-Keller *et al.* 2012). V off-line uspořádání probíhá obohacení odděleně od analýzy na hmotnostním spektrometru a nedochází tak ke kontaktu rozpouštědel, zejména pak silně kyselých nanášecích a elučních pufrů s analytickým systémem. V důsledku toho je zajištěna vysoká selektivita a LC-MS/MS analýza není rušena potenciálními kontaminanty (Jensen a Larsen 2007). Vedle toho však také existuje on-line uspořádání, kde kolona s oxidem titaničítým je součástí LC-MS/MS systému tak, jak jej použil Pinkse *et al.* Vzhledem k tomu, že zde nelze použít kompetitivní složky v podobě organické kyseliny, jako tomu bylo v off-line uspořádání, čelí tato metoda nízké selektivitě (Lemeer *et al.* 2008). Jako možné řešení této nevýhody bylo navrženo sendvičové uspořádání kolon C18-TiO₂-C18 a přidání aditiv do elučního pufru jako je fosforečnan sodný, fluorid draselný a vanadičnan sodný (Lemeer *et al.* 2008).

Skutečnost, že oxid titaničitý vykazuje vysokou afinitu k organickému fosfátu podobně, jako ionty některých kovů používaných v IMAC, je dnes velmi dobře známá. V nedávné době bylo publikováno několik studií s cílem porovnat výsledky IMAC a afinitní chromatografie na oxidu titaničitém. Jensen a Larsen ve své práci došli k závěru, že metoda na oxidu titaničitém s použitím kyseliny glykolové jako

kompetitivní složky vykazuje vyšší selektivitu než IMAC (Jensen a Larsen 2007). Podobný výsledek byl publikován v práci Cantin *et al.* 2007. Naproti tomu studie Bodenmillera *et al.*, která porovnála IMAC, oxid titaničitý a chemickou metodu β -eliminace, odhalila nejvyšší selektivitu u IMAC (Bodenmiller *et al.* 2007). Z rozdílnosti výsledků je tedy zřejmé, že selektivita uvedených metod je velmi závislá na podmínkách, za kterých je experiment vykonáván. Dále bylo prokázáno, že oxid titaničitý je na rozdíl od IMAC tolerantní vzhledem k solím, detergentům a reagentům běžně používaných v biologickém a biochemickém výzkumu, jako je Triton-X100, dodecylsulfát sodný (SDS) nebo ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Jensen a Larsen 2007).

Je známo, že oxid titaničitý má vysokou afinitu vzhledem k vícenásobně fosforylovaným peptidům (Thingholm *et al.* 2008). To představuje problém při jejich eluci, neboť mnohonásobně fosforylované peptidy jsou k oxidu titaničitému vázány relativně silnou vazbou. Z toho důvodu je pro purifikaci vícenásobně fosforylovaných peptidů preferována metoda IMAC (Jensen a Larsen 2007, Thingholm *et al.* 2008).

Inovativní metodou, která kombinuje výhody oxidu titaničitého a IMAC, se stala IMAC se sekvenční elucí (SIMAC). Metoda je citlivá jak na jednonásobně, tak vícenásobně fosforylované peptidy. Fosfopeptidy, které se nenavážou na IMAC, jsou sbírány a obohacovány na koloně s oxidem titaničitém. Tím je dosaženo vysoké účinnosti a selektivity (Thingholm *et al.* 2008; Engholm-Keller *et al.* 2012).

1.4.5 MS analýza fosforylací

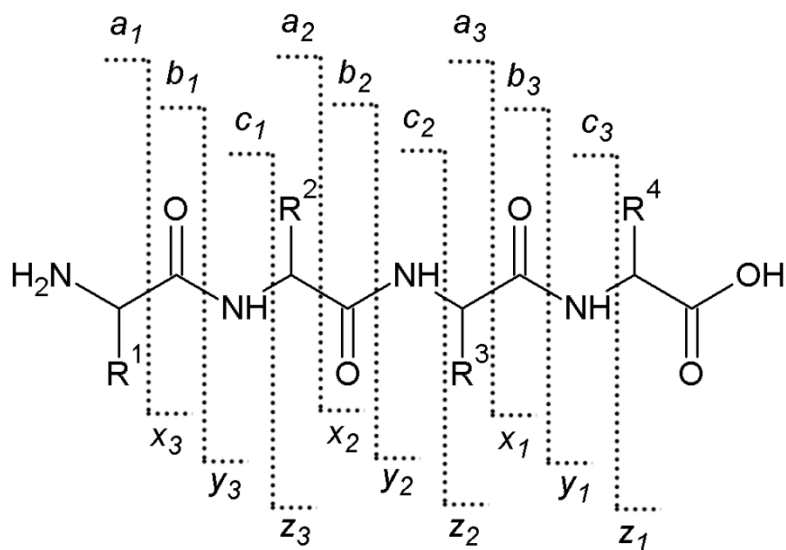
V dnešní době se k MS analýze fosforylací nejčastěji používá tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS), přičemž jsou k ní využívány různé typy analyzátorů. Příkladem je iontová past, trojnásobný kvadrupólový analyzátor (QqQ), hybridní analyzátor typu Q-TOF, cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) (Zubarev *et al.* 1998) nebo LTQ-Orbitrap (Makarov 2000). Ke každé z těchto metod se pak vážou různé techniky fragmentace.

Hmotnostními spektrometry typu QqQ nebo Q-TOF jsou nejčastěji vybaveny kolizně indukovanou fragmentací (CID). Při ní dochází ke srážkám ionizovaných peptidů s molekulami inertního plynu (např. He nebo Ar). Kinetická energie je rozdělována v rámci peptidového řetězce a v důsledku vibrací jader dochází k rozrušení nejméně stabilních kovalentních vazeb. To vede ke vzniku N-terminálních

iontových sérií značených *a*, *b* a C-terminálních sérií *x*, *y* (Obrázek 7). Protože jsou ale fosforylace značně nestabilní, dochází přednostně k odštěpení fosfokupiny a tím je možno detekovat tzv. neutrální ztrátu. V případě serinu a threoninu se jedná o neutrální ztrátu 98 Da, což odpovídá odštěpení H_3PO_4 . Fosforylace tyrozinu je stabilnější a při stejné energii je generována neutrální ztráta 80 Da jako důsledek odštěpení HPO_3 . (Roepstorff *et al.* 1984; Biemann *et al.* 1988). Na základě možnosti detekce neutrální ztráty byly vyvinuty skenovací módy, které umožňují identifikaci fosforylací. Nejjednodušším módem je MS/MS detekce ztráty H_3PO_4 z rozdílů hmotnosti mezi spektrem prekurzorových iontů a spektrem fragmentů o výše jmenovaných 98 Da (Covey *et al.* 1991).

S hmotnostními spektrometry na základě iontové pasti se pojí fragmentační metody CID, vícestupňová aktivace (MSA), vysokoenergetická C-trap disociace (HCD) a disociace přenosem elektronu (ETD).

Při MSA je dodána aktivační energie současně jak fosforylovaným prekurzorům, tak také iontům s hodnotou m/z s předpokládanou neutrální ztrátou, čímž dochází k komplexní fragmentaci všech prekurzorů, které jsou zadržovány v iontové pasti. Tím je dosaženo kombinovaného spektra, které zahrnuje jak informace z hmotnostního spektra, tak informace o iontech neutrální ztráty (Schroeder *et al.* 2004). Poslední studie prokázaly, že ačkoliv je MSA pomalejší než CID, lze pomocí ní identifikovat více unikátních fosfopeptidů (Ulitz *et al.* 2009; Timm *et al.* 2010).



Obrázek 7 Názvosloví iontových sérií vznikajících při fragmentaci peptidů. Adaptováno podle Palumbo *et al.* 2011.

Často používanou metodou fragmentace ve spojitosti s popularitou Orbitrapových analyzátorů je dnes HCD. Tato metoda produkuje kromě *b* a *y* iontů také další typy, čímž jsou získány další užitečné informace (např. fosfotyrozinyvým imoniovým iont, který usnadňuje identifikaci fosforylace tyrozinu). Metoda například umožňuje od sebe rozlišit hmotnostně velmi podobné struktury jako je Lys od Gln nebo Leu od Ile (Olsen *et al.* 2007).

ETD vychází z modelu disociace elektronovým záchytem, původně navrženým pro FT-ICR (Zubarev *et al.* 2000). Zde dochází k přenosu elektronu z jednoelektronového donoru, čímž je akceptorový peptid redukován a fragmentován. Vhodnými donory se ukázaly být anionty s nižší elektronovou afinitou, jakými jsou anthracen nebo azobenzen (Syka *et al.* 2004). Fragmentace pomocí ETD poskytuje *c* a *z* ionty (Obrázek 7) a nejvyšší účinnost má při výběru prekurzorů s nábojem 3+ a více. Výhodou ETD je skutečnost, že při fragmentaci přednostně dochází ke štěpení peptidové páteře a posttranslační modifikace jsou zachovány. Tím je umožněna jejich přímá identifikace (Good *et al.* 2007).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES/NaOH pH 7,5) (Sigma), chlorid sodný (Lachner), IGEPAL CA 630 (Sigma), deoxycholát sodný (Sigma), dodecylsulfát sodný (SDS) (Serva), chlorid hořečnatý (Lachner), dithiothreitol (DTT) (Sigma), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma), Roche EDTA free (Sigma), vanadičnan sodný (Sigma), fluorid sodný (Sigma), β -glycerolfosfát (Sigma), molybdenan sodný (Sigma), tartarát sodný (Sigma), butyrát sodný (Sigma), benzoasa (Novagen), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Thermo Scientific), aceton (Sigma), bovinní sérový albumin (BSA) (Sigma), bikarbonát triethylamonný (TEAB) (Fluka), močovina (Sigma), thiomčovina (Fluka), tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) (Fluka), iodoacetamid (IAM) (Sigma), trypsin (katedra biochemie UP), kyselina trifluoroctová (TFA) (Sigma), kyselina mravenčí (FA) (Sigma), acetonitril (ACN) (Sigma), methanol (Merck), Quant-iT Protein Assay Kit (Invitrogen), peptidy BSA (Bruker Daltonics), adenosin trifosfát (ATP) (Sigma), hydroxid amonný (Merck), kyselina octová (AA) (Fluka); kyselina 1-oktansulfonová (OSA) (Sigma); kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB) (Sigma); kyselina heptafluoromáselná (HFBA) (Sigma), kyselina L-glutamová (Sigma); kyselina glykolová (Sigma), kyselina mléčná (Sigma), 2-propanol (Fluka), deionizovaná voda (Fluka), Titanspere TiO₂ 10 μ m (GL Sciences Inc. Japan), 3M Empore C8 extraction disk, 3M Empore C18 extraction disk, Macro SpinColumn (Harvard apparatus)

2.2 Použité přístrojové vybavení

Thermomixer Eppendorf Comfort, ThermoStat Eppendorf Plus, sonifikační lázeň Kraintek, Eppendorf Concentrator Plus, centrifuga IEC CL31R Multispeed, Vortex mixer Stuart SA8, spektrofotometr Synergy H4 Hybrid Reader (BioTek)

2.3 Použité nástroje a materiál

Pipeta Eppendorf Research 1-10 μ l, pipeta Eppendorf Research 10-100 μ l, pipeta Eppendorf Research 100-1000 μ l, příslušné špičky (Eppendorf), špičky GE Loader 0,5-20 μ l (Eppendorf), pipeta Hamilton-Bonaduz Schweiz 500 μ l, Hamiltonovy jehly

(průměr 18G a 22G), 96-jamková elisa deska, 96-jamková deska určená pro měření fluorescence, mikrozkuhavky (Eppendorf), skleněné vialky s kónickým dnem (Waters), skleněné Total Recovery vialky (Waters), kalibrované pH papírky (Sigma).

2.4 Použité roztoky

Příprava HeLa lyzátu

Lyzační pufr: 25mM HEPES/NaOH pH 7,5; 150mM NaCl; 1% IGEPAL CA 630; 0,1% deoxycholát sodný; 0,1% SDS; 1mM MgCl₂; 1mM DTT; 1mM PMSF; Roche EDTA free (50x); 1mM Na₃VO₄; 10mM NaF; 5mM β-glycerolfosfát; 1mM Na₂MoO₄; 4mM tartarát sodný; 10mM butyrát sodný

Močovinový pufr: 100mM TEAB pH 8,0; 6M močovina; 2M thiomčovina

Redukční činidlo: 100mM TEAB pH 8,0; 25mM TCEP

Alkylační činidlo: 100mM TEAB pH 8,0; 330mM IAM

Nanášecí pufr pro C18 purifikaci: 30% TFA

Promývací pufr pro C18 purifikaci: 0,4% FA; 2% TFA

Eluční pufr pro C18 purifikaci: 90% ACN; 50mM TEAB

Roztok pro rozpuštění peptidů před MS měřením: 0,5% FA

Izolace fosfopeptidů

Nanášecí pufr A: 1% TFA; 30% ACN

Promývací pufr A₁: 1% TFA; 50% ACN

Promývací pufr A₂: 1% TFA; 75% ACN

Nanášecí pufr B: 20% AA; 420mM OSA; 50 mg/ml DHB; 0,1% HFBA

Promývací pufr B: 0,1% TFA; 80% ACN

Nanášecí pufr C: 2% TFA; 65% ACN; saturovaná kyselina glutamová (25 mg·ml⁻¹)

Promývací pufr C₁: 0,5% TFA; 65% ACN

Promývací pufr C₂: 0,1% TFA; 65% ACN

Nanášecí pufr D: 5% TFA; 80% ACN; 1M kyselina glykolová

Promývací pufr D₁: 1% TFA; 80% ACN

Promývací pufr D₂: 0,1% TFA; 20% ACN

Nanášecí pufr E: 0,1% TFA, 70% (v/v) ACN, 3,33M kyselina mléčná

Promývací pufr E: 0,1% TFA, 70% ACN

Eluční pufr 1: 40% ACN; 1% NH₄OH

Eluční pufr 2: 40% ACN; 1% NH₄OH; 50mM ATP

Přečištění izolovaných fosfopeptidů na C18 reverzní fázi

Aktivační roztok: 100% 2-propanol

Nanášecí a promývací roztok: 5% FA

Eluční roztok: 50% methanol; 2,5% FA

2.5 Metody

2.5.1 Příprava HeLa lyzátu

Lýze buněk linie HeLa S3

K peletu HeLa S3 buněk byl napipetován lyzační pufr o objemu 100 μ l na buňky sklizené z jedné kultivační desky. Pomocí Hamiltonovy pipety byla suspenze desetkrát nasáta a vypuštěna. Poté bylo přidáno 200 U benzoasy (8 μ l), suspenze byla promíchána a inkubována 15 minut na ledu. K suspenzi bylo přidáno dalších 200 U benzoasy a bylo pokračováno v inkubaci na ledu dalších 15 minut. Následovala centrifugace 15 minut při 15000 G a 4 °C. Supernatant byl přepipetován do čisté mikrozkušavky a centrifugován dalších 30 minut při 30000 G a 4 °C.

Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Do 96-jamkové desky bylo napipetováno 10 μ l 10x zředěného vzorku ve čtyřech opakováních. Do dalších jamek bylo jako blank napipetováno 10 μ l 10x zředěného lyzačního pufru, a to také ve čtyřech opakováních. Dále byla do 96-jamkové desky ve dvou opakováních napipetována po 10 μ l série standardů BSA o koncentraci 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 a 0 μ g· μ l⁻¹. Ke vzorku a standardům bylo přidáno 300 μ l barviva Coomassie Brilliant Blue a 96-jamková deska byla 5 minut inkubována při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm a regresně byla stanovena koncentrace proteinů (μ g· μ l⁻¹).

Precipitace proteinů

Objem získaného buněčného lyzátu byl změřen pipetováním a zaznamenán a k lyzátu byl přidán vychlazený aceton ve čtyřnásobném objemovém nadbytku. Po důkladném promíchání byl vzorek inkubován přes noc při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Následující den proběhlo promývání proteinů v čistém acetonu. Precipitát byl nejprve centrifugován 15 minut při 30000 G a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl opatrně odstraněn a pelet byl promyt 1 ml čistého acetonu. Následovala centrifugace po dobu 10 minut při 10000 G a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byl opatrně odstraněn supernatant, pelet byl znovu promyt v 1 ml čistého acetonu a opět centrifugován 10 minut při 10000 G a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Od precipitátu bylo opatrně odpipetováno přibližně 80 % objemu acetonu a zbytek byl odpařen ve vakuové odparce při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Štěpení

K proteinovému peletu byl přidán močovinový pufr o objemu 50 μl na každých 500 μg proteinů. Následovalo rozpouštění proteinů za neustálého promíchávání po dobu 2 hodin při 1200 rpm a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorek byl poté rozpipetován po 50 μl do skleněných vialek s kónickým dnem. Do vialek bylo k proteinům přidáno redukční činidlo TCEP ve výsledné koncentraci 5 mM (12,5 μl zásobního roztoku o koncentraci 25 mM, viz výše). Následovala inkubace po dobu 45 minut při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté bylo přidáno alkylační činidlo IAM ve výsledné koncentraci 55 mM (12,5 μl zásobního roztoku o koncentraci 330 mM, viz výše) a vialky byly inkubovány 30 minut při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve tmě. Vzorky byly dále zředěny 425 μl deionizované vody, jejich pH bylo změřeno pomocí kalibrovaných pH papírků a v případě potřeby upraveno na 7,5-8,5 přidávkem 1M TEAB. Ke vzorkům byl v posledním kroku přidán trypsin v poměru 1:20 (trypsin:proteiny; 25 μg trypsinu na vialku) a vzorky byly inkubovány 16 hodin při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Purifikace na C18 reverzní fázi

Ke vzorkům bylo přidáno 5 μl roztoku 30% TFA tak, aby pH vzorku bylo sníženo na méně než 5. Byl připraven příslušný počet Macro Spin kolon (kapacita 500 μg peptidů), které byly upevněny ve 2ml mikrozkuvkách. Kolony byly aktivovány nanesením 200 μl 100% methanolu a centrifugovány 1 minutu při 1000 rpm a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Proces aktivace byl zopakován. Následovala ekvilibrace přidávkem 200 μl

promývacího pufru a centrifugace 1 minutu při 1000 rpm a 25 °C. Krok ekvilibrace byl zopakován.

Na kolony byly naneseny okyselené vzorky a kolony byly centrifugovány 2 minuty při 800 rpm a 25 °C. Poté bylo do kolon napipetováno 200 µl promývacího pufru a kolony byly centrifugovány 1 minutu při 1400 rpm a 25 °C. Proces promývání byl zopakován. Kolony byly poté upevněny do čistých mikrozkušavek.

Eluce proběhla nanesením 200 µl elučního pufru a následnou centrifugací 2 minuty při 800 rpm a 25 °C. Eluční krok byl zopakován. Kolony byly na závěr centrifugovány 2 minuty při 2000 rpm a 25 °C.

Eluát byl přenesen do skleněných vialek a odpařen ve vakuové odparce (při 30 °C)

Odparek byl rozpuštěn v deionizované vodě na předpokládanou koncentraci 5 µg·µl⁻¹, 15 minut sonikován a 15 minut vortexován.

Stanovení obsahu peptidů (Quant-iT Protein Assay Kit)

Bylo připraveno 2,5 ml pracovního roztoku Quant-iT Protein Assay Kit, který obsahoval směs reagentů A a B v poměru 1:200. Vzorek byl zředěn 50× do objemu 100 µl. Do 96-jamkové desky určené pro měření fluorescence bylo napipetováno 5 µl vzorku v šesti opakováních. Dále byl do desky napipetován standard peptidů BSA o množství 200 a 400 ng ve dvou opakováních. Ke vzorkům a standardu bylo přidáno 200 µl pracovního roztoku. Deska byla inkubována ve tmě po dobu 10 minut a fluorescence byla proměřena při 470/570 nm a senzitivitě 75. Byla vynesena závislost RFU na množství peptidů a pomocí lineární regrese bylo kvantifikováno množství peptidů ve vzorku.

Pro kontrolní LC-MS/MS analýzu (ověření kvality štěpení) bylo následně připraveno 100 µl vzorku o koncentraci 0,0357 µg·µl⁻¹ a to ředěním čerstvě kvantifikovaného vzorku pomocí 0,5% (v/v) FA.

Alikvotace

Vzorek byl rozpipetován po 110 ng do skleněných vialek s kónickým dnem. Alikvóty byly při 30 °C odpařeny do sucha ve vakuové odparce a odparky byly uskladněny v -80 °C až do dalšího použití.

2.5.2 Izolace fosfopeptidů ve vsádkovém uspořádání

Izolace fosfopeptidů ve vsádkovém uspořádání byla provedena podle postupu publikovaného v Engholm-Keller *et al.* 2012.

Příprava vzorku

Peptidy (110 µg) byly rozpuštěny ve 220 µl příslušného nanášecího pufru, 10 minut sonikovány, 10 minut vortexovány a krátce zcentrifugovány.

Příprava a ekvibrace oxidu titaničitého

Do 2ml mikrozkušavky bylo naváženo přibližně přesně 5 mg oxidu titaničitého. K němu byl přidán 1 ml 100% ACN. Oxid titaničitý byl pipetováním rozsuspendován a 5 minut sonikován. Suspenze byla 5 minut vortexována a ihned poté bylo 50 µl suspenze přepipetováno do čisté 2ml mikrozkušavky. Následovala centrifugace po dobu 2 minut při 10000 G a 25 °C. Supernatant byl opatrně odpipetován pomocí GE Loader špičky. K usazenému oxidu titaničitému bylo přidáno 100 µl příslušného nanášecího pufru a suspenze byla promíchávána 10 minut při 1400 rpm a 25 °C. Následovala centrifugace 2 minuty při 10000 G a 25°C. Supernatant byl opatrně odpipetován.

Nanesení vzorku a promývání

K ekvilibrovanému oxidu titaničitému bylo naneseno 100 µl vzorku (50 µg peptidů na 250 µg TiO₂, poměr 1:5). Suspenze byla inkubována za neustálého míchání po dobu 30 minut při 1000 rpm a 25 °C v Thermomixeru Eppendorf. Poté byla mikrozkušavka s naneseným vzorkem centrifugována 2 minuty při 10000 G a 25 °C. Supernatant byl opatrně odpipetován, přenesen do nové mikrozkušavky a zamražen při -80 °C. Ke vzorku bylo napipetováno 100 µl nanášecího pufru, oxid titaničitý byl pipetováním rozsuspendován a přenesen do čisté 2ml mikrozkušavky. Ta byla poté centrifugována 2 minuty při 10000 G a 25°C. Supernatant byl opatrně odpipetován a ke vzorku bylo naneseno 100 µl příslušného promývacího pufru 1. Mikrozkušavka se vzorkem byla poté promíchána v Thermomixeru Eppendorf po dobu 15 sekund při 1400 rpm a 25 °C. Následovala centrifugace 2 minuty při 10000 G a 25 °C. Supernatant byl opatrně odpipetován a ke vzorku bylo napipetováno 100 µl promývacího pufru 2.

Vzorek byl opět promíchán 15 sekund při 1400 rpm a 25 °C v Thermomixeru Eppendorf a 2 minuty centrifugován při 10000 G a 25 °C. Supernatant byl opatrně odpipetován a k oxidu titaničitému bylo přidáno 100 µl deionizované vody. Vzorek byl promíchán 15 sekund při 1400 rpm a 25 °C v Thermomixeru Eppendorf a centrifugován 2 minuty při 10000 G a 25 °C. Supernatant byl následně opatrně odstraněn pipetováním.

Eluce

K promytému oxidu titaničitému bylo nanášeno 100 µl elučního pufru 1. Vzorek byl umístěn do Thermomixeru Eppendorf, kde byl inkubován po dobu 15 minut při 1000 rpm a 25 °C. Následovala centrifugace 2 minuty při 10000 G a 25 °C. Supernatant byl odpipetován a přenesen do čisté mikrozkušavky. Eluát byl okyselen 5 µl 100% FA a promíchán na vortexu. Poté byl eluát umístěn na vakuovou odparku a odpařován 30 minut při 30 °C. K oxidu titaničitému bylo napipetováno 100 µl elučního pufru 2. Vzorek byl inkubován v Thermomixeru Eppendorf po dobu 30 minut při 1000 rpm a 25 °C. Supernatant byl přidán k odpařovanému eluátu, ke kterému bylo současně napipetováno dalších 5 µl 100% FA. Eluát byl promíchán na vortexu a bylo pokračováno v odpařování při 30 °C do objemu cca 2 µl.

2.5.3 Izolace fosfopeptidů v kolonkovém uspořádání

Izolace fosfopeptidů ve vsádkovém uspořádání byla provedena dle postupu publikovaného v Rappsilber *et al.* 2007.

Příprava vzorku

Peptidy (110 µg) byly rozpuštěny v 55 µl příslušného nanášecího pufru, 10 minut sonikovány, 10 minut vortexovány a krátce centrifugovány.

Příprava a ekvibrace TiO₂ Stage Tips

Z 3M Empore disku C8 byla vyseknuta fritka pomocí Hamiltonovy jehly o průměru 22G. Fritka byla vpravena do GE Loader špičky a špička byla upevněna do 1,5ml mikrozkušavky. Do 2ml mikrozkušavky bylo naváženo přibližně přesně 5 mg oxidu titaničitého, k němuž byl přidán 1 ml 100% ACN. Oxid titaničitý byl rozsuspendován a 5 minut sonikován. Poté byl míchán 5 minut na vortexu a 50 µl

suspenze bylo ihned přepipetováno do připravené GE Loader špičky s C8 fritkou. Takto připravená kolonka byla centrifugována 2 minuty při 3000 rpm a 25 °C. Do špičky bylo napipetováno 20 µl příslušného nanášecího pufru. Následovala centrifugace při stejných parametrech a do špičky bylo přidáno dalších 20 µl nanášecího pufru. Kolonka byla před nanesením vzorku znovu centrifugována 2 minuty při 3000 rpm a 25 °C.

Nanesení vzorku a promývání

Ekvilibrovaná kolonka byla upevněna do čisté 1,5ml mikrozkušavky. Do špičky bylo nanášeno 25 µl vzorku (50 µg peptidů na 250 µg TiO₂, poměr 1:5). Vzorek byl centrifugován 5 minut při 2000 rpm a 25°C. Na kolonku bylo nanášeno 20 µl nanášecího pufru a kolonka byla centrifugována 2 minuty při 3000 rpm a 25 °C. Poté bylo na oxid titaničitý nanášeno 20 µl promývacího pufru 1 a kolonka byla centrifugována 2 minuty při 3000 rpm a 25 °C. Tento krok byl následně zopakován s promývacím pufrům 2. Posledním krokem promývání bylo nanesení 20 µl 40% ACN a centrifugace 2 minuty při 3000 rpm a 25 °C.

Eluce

Špička s promytým oxidem titaničitým byla upevněna do nové 1,5ml mikrozkušavky obsahující 10 µl 25% FA. Do špičky bylo nanášeno 20 µl elučního pufru 1 a byla provedena centrifugace 5 minut, 2000 rpm, 25 °C. Poté bylo nanášeno 20 µl elučního pufru 2 a následovala centrifugace při stejných podmínkách. Eluát byl zakoncentrován na vakuové odparce na objem cca 2 µl.

2.5.4 Přečištění fosfopeptidů na C18 reverzní fázi

Příprava vzorku

Zakoncentrovaný vzorek byl rozpuštěn v 50 µl 5% FA, 5 minut sonikován, 5 minut vortexován a krátce centrifugován.

Příprava, aktivace a ekvibrace C18 Stage tips

Z 3M Empore disku C18 byla Hamiltonovou jehlou o průměru 18G vyseknuta fritka. Ta byla vpravena do zastřížené 200µl špičky a špička byla upevněna do 1,5ml

mikrozkumavky. Kolonka byla aktivována 50 μ l 100% 2-propanolu a centrifugována 1,5 minuty při 4000 G a 25 °C. Na kolonku bylo dále nanášeno 50 μ l 5% FA a byla zopakována centrifugace. Kolonka byla upevněna do čisté mikrozkumavky.

Nanesení vzorku a promývání

Na C18 kolonku byl nanášen vzorek a následovala centrifugace 2,5 minuty při 1000 G a 25 °C. Kolonka byla poté promyta 50 μ l 5% FA a centrifugována 1,5 minuty při 2000 G a 25 °C. Tento krok byl opakován ještě jednou. Poté byla kolonka přenesena a upevněna do nové mikrozkumavky.

Eluce

Následovala eluce fosfopeptidů 50 μ l elučního roztoku a centrifugace 2,5 minuty při 1000 G a 25 °C. Eluční krok byl zopakován a eluát byl přepipetován do skleněné Total Recovery vialky. Poté byl eluát odpařen do sucha na vakuové odparce (15 minut, 30 °C) a odparek byl buď uskladněn při –80 °C, a nebo rozpuštěn ve 28 μ l 0,5% FA a ihned analyzován pomocí LC-MS/MS.

2.5.5 LC-MS/MS analýza

Analýza veškerých vzorků byla provedena na systému nanokapilární chromatografie (nLC) (nanoEASY, Proxeon, Nizozemí, Bruker Daltonics, Německo) s tandemovou hmotnostní detekcí Q-TOF vybavenou ESI ionizací (UHR-Q-TOF maXis, Bruker Daltonics, Německo). Rozmražené vzorky byly ultrazvukovány po dobu 5 min a přeneseny do autosampleru nLC. Do nLC systému bylo nastříknuto 7 μ l vzorku (v případě vzorků připravených pro kontrolu kvality štěpení se jednalo o objem obsahující 250 ng peptidů; v případě vzorků s obohacenými fosfopeptidy se jednalo o 25 % z daného vzorku) a peptidy byly zachyceny na nanokapilární předkoloně (75 μ m \times 3 cm, IntegraFrit, New Objective, CA, USA) naplněné reverzní fází (Reprosil GOLD C18, 5 μ m, Dr. Maisch GmbH, Německo). Po izokratickém promytí zachycených peptidů pomocí 10 μ l 2% FA byly tyto peptidy postupně uvolňovány pomocí 125minutové gradientové eluce (Tabulka 1) na analytickou nanokapilární kolonu (50 μ m \times 15 cm, SilicaTip, New Objective, CA, USA) naplněnou reverzní fází (Reprosil GOLD C18, 3 μ m, Dr. Maisch GmbH, Německo) při průtoku 80 nl·min⁻¹.

Složení mobilních fází bylo následující: pufr A: 0,4% FA ve vodě, pufr B: 0,4% FA v 80% acetonitrilu.

Tabulka 1 Nastavení nLC 125minutového gradientu pro eluci peptidů z reverzní nanokapilární kolony.

Čas	Pufr A (%)	Pufr B (%)
0	98	2
3	92	8
50	82	18
79	72	28
85	68	32
93	55	45
99	35	65
100	5	95
105	5	95
108	98	2
124	98	2

Peptidy eluované z analytické kolony byly analyzovány po elektrospray ionizaci pomocí tandemové hmotnostní analýzy metodou „data-dependent analysis (DDA)“ s kolizí indukovanou fragmentací peptidů v kolizní cele. Nastavení hmotnostního analyzátoru bylo následující: Zdroj (Source; capillary voltage 1900 V; Dry gas: 2,5 l·min⁻¹; Dry temperature: 160 °C); Tune Page nastavení (Ion funnel RF 400 Vpp; Multipole RF 400 Vpp; Quadrupole ion energy 5 eV; collision energy 8 eV; Collision RF 1200 Vpp; Ion cooler RF 350 Vpp; transfer time 85 μs; pre-puls storage 7 μs); MS/MS nastavení (Auto MSMS on; 4 precursor ions; threshold pro přepínání z MS na MSMS mód 5000 cts; active exclusion po 3 spektrech po dobu následujících 9 s; excluded mass rozsah prekurzorů 50-350 Da and 1500-2200 Da). MS data byla sbírána v hmotnostním rozsahu 50-2200 m/z s dobou sběru (acquisition time) 500 ms pro MS a 250-750 ms pro MS/MS v závislosti na intenzitě prekurzoru.

2.5.6 Zpracování dat

Uložená surová data byla zpracována pomocí programu DataAnalysis v. 4.2 (Bruker Daltonics, Německo) a převedena do formátu mgf (Mascot generic files) obsahujícího seznamy měrných hmotností prekurzorů a jejich fragmentační spektra. Tyto soubory byly použity k databázovému prohledávání pomocí Mascot algoritmu (in-

house mascot server, Matrix Science, England, UK) proti databázi UniProt human ver. 201207 (86725 sekvencí, UniProtKB; www.UniProt.org). Prohledávání proběhlo s následujícím nastavením: použitá proteasa ke štěpení: trypsin; maximální povolený počet vynechaných štěpných míst (miss cleavage) 1; povolené modifikace peptidů: karbamidomethylace cysteinů jako pevná (fixed), acetylace lyzinů, acetylace N-konců proteinů, oxidace methioninu, fosforylace serinu, threoninu a tyrosinu byly nastaveny jako variabilní; povolené odchylky pro MS prekurzorů: 10 ppm a pro MS/MS fragmentace peptidů 0,1 Da; minimální skóre pro identifikaci peptidů 15, minimální délka peptidu 7 aminokyselin; significance threshold $p < 0,05$. Výsledky prohledávání a identifikace peptidů byly exportovány ve formě DAT souborů a byly společně s odpovídajícími mgf soubory použity k dalšímu bioinformatickému zpracování pomocí programu Trans-proteomic pipeline (TPP) v. 4.6.2 (Keller *et al.* 2005).

V programu TPP byl nastaven prohledávací algoritmus MASCOT a databáze UniProt human ver. 201207. DAT soubory byly konvertovány do formátu XML a statisticky zpracovány modulem PeptideProphet (Keller *et al.* 2002) za použití nastavení „use phospho information“ a „use accurate mass binding“. Výsledné tabulky byly převedeny do formátu XLS a vyhodnocení výsledků bylo provedeno v programu MS Excel.

2.6 Výsledky a diskuze

2.6.1 Experimentální strategie

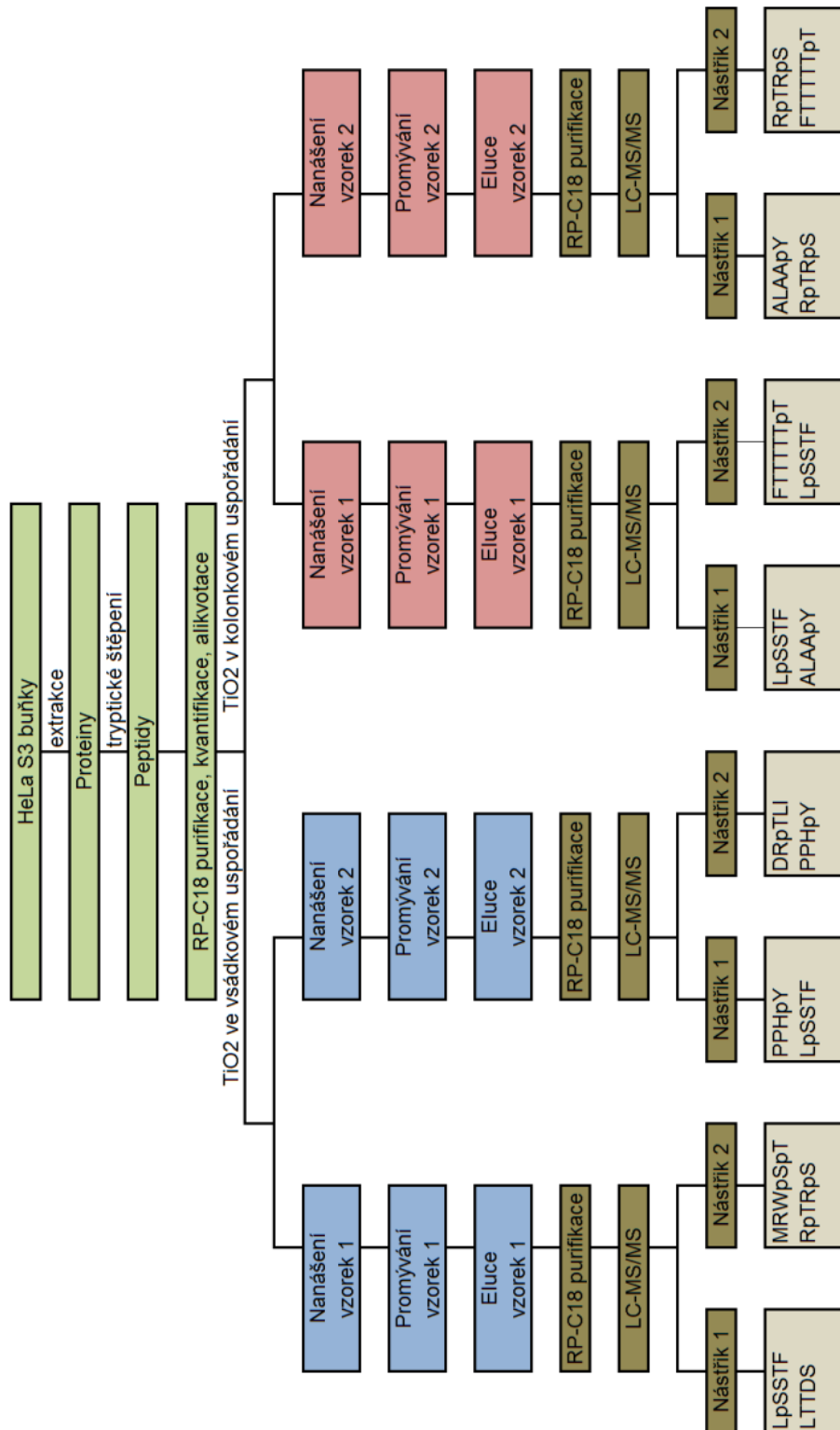
Jak již bylo naznačeno v předchozích kapitolách, afinitní chromatografie na oxidu titaničitým se stala účinnou a často používanou metodou selektivního obohacení fosfopeptidů. Přesto se tato technika potýká s problémy, z nichž nejvýznamnějším jsou nescifické interakce kyselých peptidů s oxidem titaničitým. V posledním desetiletí byla proto vyvinuta nemalá snaha v jejím zdokonalení a ukázalo se, že přidavek alifatických organických kyselin do nanášecího pufru vede v tomto směru k výraznému zlepšení. Autoři nezávisle na sobě představili a úspěšně použili hned několik takových aditivních kyselin.

Tato část práce je věnována experimentálnímu ověření účinnosti vybraných aditivních organických kyselin na výtěžek a selektivitu obohacení fosforylovaných peptidů afinitní chromatografií na oxidu titaničitým. S ohledem na dostupné protokoly publikované v posledních několika letech byly vybrány následující pufrы (resp. pufrové systémy):

- **Pufr A:** bez přidavku aditivní kyseliny (Aryal a Ross 2010)
- **Pufr B:** směs kyselin OSA, DHB, HFBA (Mazanek *et al.* 2010)
- **Pufr C:** kyselina glutamová (Wu *et al.* 2007)
- **Pufr D:** kyselina glykolová (Jensen a Larsen 2007)
- **Pufr E:** kyselina mléčná (Sugiyama *et al.* 2007)

Jako biologický materiál byla vybrána buněčná linie HeLa S3. Z hlediska fosforylací se jedná o velmi dobře definovaný materiál (Beausoleil *et al.* 2004; Amanchy *et al.* 2005; Olsen *et al.* 2006), který je dnes v proteomice považován za proteinový standard. Lýze buněk (cca 120 milionů) a extrakce proteinů byla podle protokolu provedena pomocí směsi denaturujících a nendenaturujících detergentů. Výtěžek extrakce dosáhl 10,5 mg proteinů. Následovalo tryptické štěpení a kvantifikace vzniklých peptidů. Výtěžek štěpení byl stanoven na 3,5 mg tryptických peptidů, což značí úspěšnost štěpení 33,3%.

Jako výchozí množství pro separace fosfopeptidů bylo zvoleno 50 µg peptidů. Takovéto množství totiž neklade nároky na biologický materiál, je poměrně snadno dosažitelné a je dostatečně velké na to, aby poskytovalo reprodukovatelné výsledky.

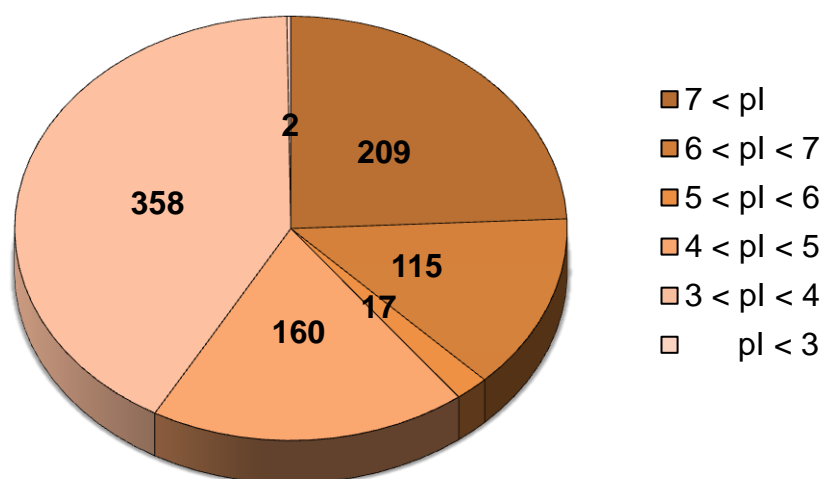


Obrázek 8 Schéma experimentů.

Pro každý z vybraných pufrových systémů bylo provedeno selektivní obohacení fosfopeptidů ve vsádkovém a kolonkovém uspořádání s použitím 250 µg oxidu titaničitého (hmotnostní poměr peptidy:TiO₂ 1:5, viz Kettenbach a Gerber 2011; Li *et al.* 2009), a to ve dvou technických opakováních. Každý ze získaných vzorků byl následně analyzován ve dvou nezávislých LC-MS/MS analýzách (Obrázek 8). Ze získaných dat byly vytvořeny seznamy peptidů, z nichž byl stanoven počet fosforylovaných a nefosforylovaných peptidů izolovaných příslušnou metodou.

2.6.2 Přímé srovnání metod pro obohacování fosfopeptidů pomocí TiO₂

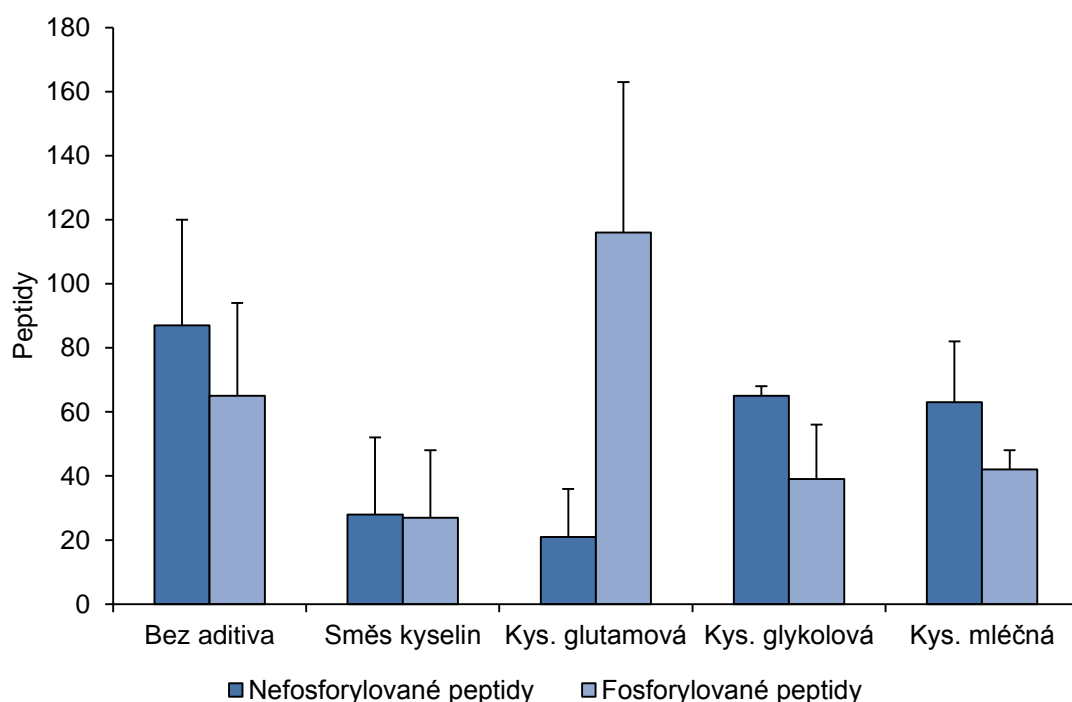
V rámci této studie bylo identifikováno celkem 516 unikátních fosforylovaných a 861 nefosforylovaných peptidů. Na jednu LC-MS/MS analýzu pak bylo identifikováno průměrně cca 60 fosfopeptidů, přičemž nejnižší počet detekovaných fosfopeptidů byl 3 a nevyšší 166. Při srovnání s dostupnou literaturou pak tato data odpovídají výsledkům dosažených autory studií, ve kterých byl jako biologický materiál použit komplexní buněčný lyzát. Průměrné počty fosfopeptidů na jednu analýzu se totiž pohybují v rozmezí 70 až 160 (Sugiyama *et al.* 2007; Li *et al.* 2009; Kettenbach a Gerber 2011).



Obrázek 9 Poměrové zastoupení všech nefosforylovaných peptidů podle *pI*. Hodnoty byly získány s použitím on-line aplikace *Protein Cutter* (Raus *et al.* 2013; <http://biochemie.upol.cz/software/proteincutter/>).

Další výrazné shody s literaturou bylo dosaženo při analýze složení nefosforylovaných peptidů. Její výsledky ukázaly, že u více než 75 % z celkových

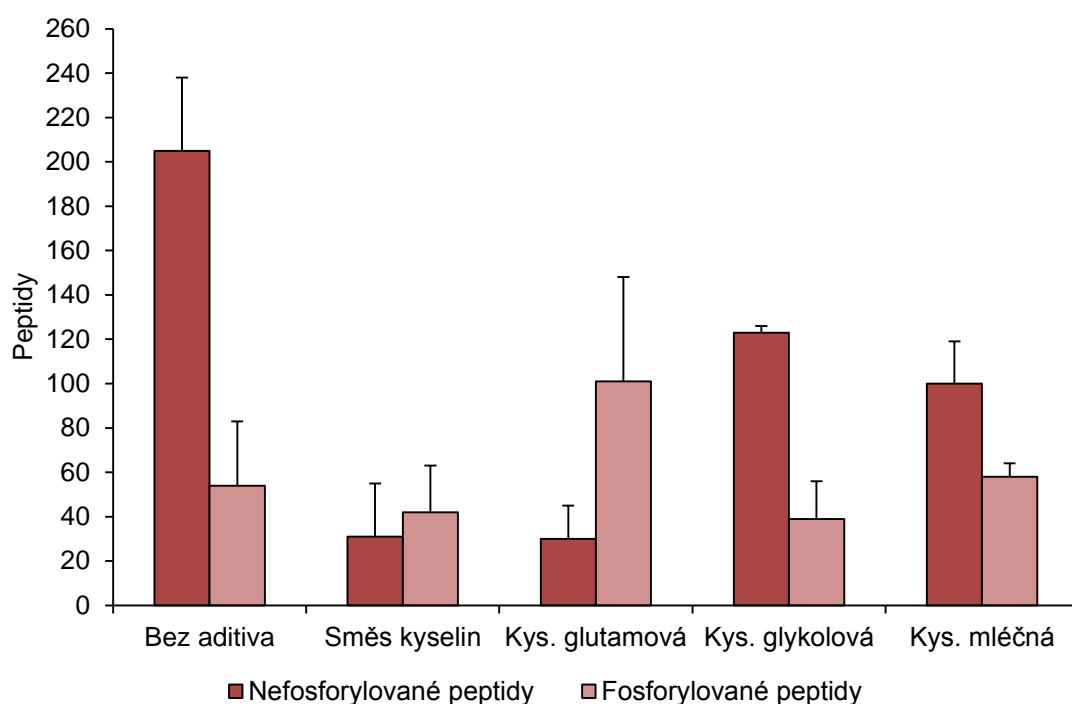
861 nefosforylovaných peptidů byly zaznamenány hodnoty *pI* menší než 7 a výrazné zastoupení kyselých aminokyselin (Obrázek 9). To odpovídá teorii, že kontaminace selektivního obohacení je způsobena převážně kyselými peptidy, které se svými deprotonizovanými karboxylovými skupinami přednostně vážou na oxid titaničitý (Kuroda *et al.* 2004; Pinkse *et al.* 2004; Larsen *et al.* 2005; Jensen a Larsen 2007).



Obrázek 10 Výtěžky peptidů ve vsádkovém uspořádání. Hodnoty byly vypočítány jako průměr počtu fosforylovaných a nefosforylovaných peptidů detekovaných ve čtyřech nezávislých LC-MS/MS analýzách 25 % eluátu z oxidu titaničitého.

Nejvyššího výtěžku v součtu fosforylovaných a nefosforylovaných peptidů dosáhla jak v případě vsádkového (Obrázek 10), tak kolonkového uspořádání (Obrázek 11) metoda bez aditivní organické kyseliny. Vysoký nadbytek nefosforylovaných peptidů a nízký podíl fosfopeptidů, tedy nízká selektivita (Obrázek 12), především v kolonkovém uspořádání, však značí, že prosté okyselení pufru a protonizace kyselých nefosforylovaných peptidů není pro selektivní obohacení dostatečné. Tato skutečnost již byla několikrát dokumentována v pracích, kde ke zvýšení selektivity autoři použili některý z uvedených kompetitorů (Jensen a Larsen 2007; Sugiyama *et al.* 2007; Wu *et al.* 2007; Mazanek *et al.* 2010).

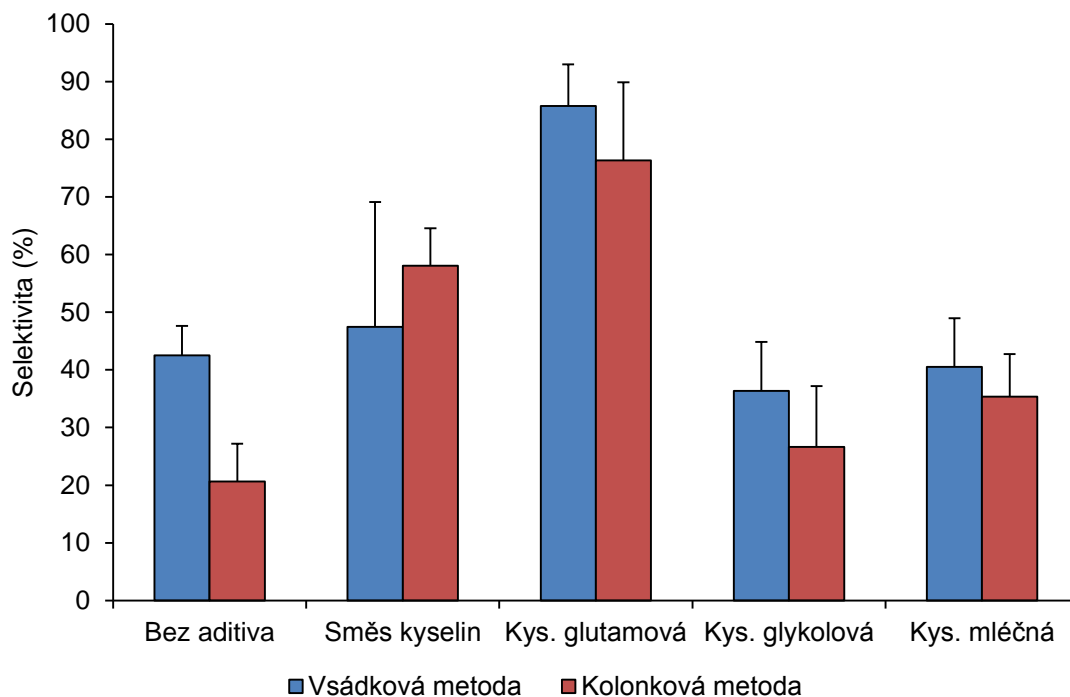
Zajímavého výsledku bylo dosaženo při použití směsi kyselin dle studie Mazanek *et al.* 2010. Tato metoda vykazovala selektivitu přes 50% (Obrázek 12), ale výtěžek fosfopeptidů byl nejnižší ze všech testovaných metod (Obrázek 10, Obrázek 11, Tabulka 2). Kettenbach a Gerber v práci z roku 2011 diskutují možnost, že vysoké koncentrace organických kyselin mohou vést k protonizaci fosforylové skupiny nebo k přímé kompetici s oxidem titaničitým a tím k vytěšňování fosfopeptidů z chromatografické kolony (Kettenbach a Gerber 2011). S ohledem na toto zjištění se lze domnívat, že při použití směsi kyselin OSA, DHB a HFBA může docházet ke stejnému jevu. Navíc vzhledem k vysoké hustotě nanášecího pufru bylo z praktického hlediska provedení vsádkové i kolonkové metody značně problematické.



Obrázek 11 Výtěžky peptidů v kolonkovém uspořádání. Hodnoty byly vypočítány jako průměr počtu fosforylovaných a nefosforylovaných peptidů detekovaných ve čtyřech nezávislých LC-MS/MS analýzách 25 % eluátu z oxidu titaničitého.

Nejlepších výsledků dosáhla kyselina glutamová. To dokazuje průměrný výtěžek 116 fosfopeptidů ve vsádkovém (Obrázek 10) a 101 v kolonkovém uspořádání (Obrázek 11) a průměrná selektivita 84,3 %, resp. 76,7 % (Obrázek 12). Navíc celkový počet fosfopeptidů izolovaných s použitím kyseliny glutamové dosáhl 349, což představuje 2× až 3× více než u ostatních metod (Tabulka 2). Lze tedy usoudit, že při

experimentálních podmínkách popsaných v této práci je kyselina glutamová nejúčinnější kompetitivní kyselinou. Podobných výsledků bylo dosaženo v práci Wu *et al.* 2007. Autor zde demonstroval použití kyseliny glutamové při izolaci fosfopeptidů na oxidu titaničitém, která byla následována SCX frakcionací. Kyselina glutamová v saturované koncentraci zde vedla k nárůstu selektivity od 63% do 90% v závislosti na frakci SCX.



Obrázek 12 Selektivita. Sloupce vyjadřují průměrné procentuální zastoupení fosforylovaných peptidů izolovaných s použitím dané organické kyseliny.

Jako další účinný kompetitor kyselých nefosforylovaných peptidů a adekvátní náhrada do té doby používané DHB byla v roce 2007 představena také kyselina glykolová (Jensen a Larsen 2007). Z dosažených výsledků je zřejmé, že 1M kyselina glykolová do jisté míry snižuje podíl zachytávání nefosforylovaných peptidů, nezvyšuje však podíl fosforylovaných peptidů a selektivita je srovnatelná s variantou bez aditiva. To částečně potvrzuje výsledky práce Aryal a Ross 2010, kde autoři došli k závěru, že kyselina glykolová nemá na selektivní obohacení fosfopeptidů vliv. Omezená účinnost kyseliny glykolové byla dokumentována také v práci Sugiyama *et al.* 2007, kde byl z tryptických peptidů kaseinu, fetuinu a fosvitinu izolován s použitím kyseliny glykolové mírný nadbytek nefosforylovaných peptidů. Srovnání s původní literaturou

Jensen a Larsen 2007 není bohužel možné, protože autoři nepracovali s komplexním proteinovým lyzátem, ale jako materiál použili sérii standardních fosfoproteinů. Novější práce Engholm-Keller a Larsen 2012 sice pracuje s peptidy získanými štěpením komplexního proteinového lyzátu, ale používá jiný materiál (Titansphere, velikost částic 3 μm) a metodiku (eluáty z oxidu titaničitého byly dále frakcionovány pomocí metody SIMAC).

Posledním modifikátorem, který byl ve srovnání použit, byla kyselina mléčná (Sugiyama *et al.* 2007). Ta dosáhla průměrného výtěžku 42 fosfopeptidů ve vsádkovém (Obrázek 10) a 58 v kolonkovém uspořádání (Obrázek 11), přičemž průměrná selektivita se pohybovala v rozmezí 35 % až 41 % (Obrázek 12). Tento výsledek je srovnatelný s výtěžky a selektivitou kyseliny glykolové. Rozdílné hodnoty byly dosaženy v celkovém počtu unikátních fosforylovaných peptidů (176 kyselina mléčná, 118 kyselina glykolová, viz Tabulka 2).

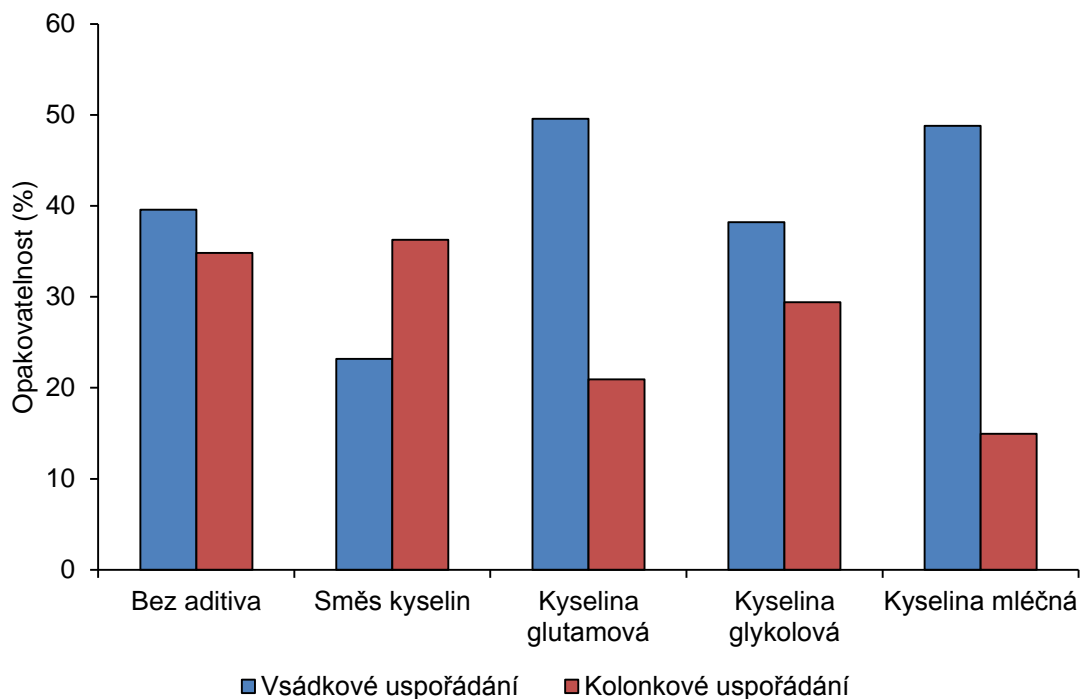
Tabulka 2 Celkový počet unikátních fosforylovaných peptidů.

	Vsádkové uspořádání	Kolonkové uspořádání	Celkem
Bez aditiva	139	110	182
Směs kyselin	66	93	122
Kys. glutamová	230	235	349
Kys. glykolová	88	80	118
Kys. mléčná	82	150	176

Dále byly srovnány průměrné a celkové výtěžky fosfopeptidů a selektivita mezi vsádkovým a kolonkovým uspořádáním. Z Obrázků 10 a 11 a Tabulky 2 vyplývá, že výtěžky vsádkové a kolonkové metody jsou přibližně stejné. Liší se však selektivita, která je s výjimkou směsi kyselin vyšší ve vsádkovém uspořádání. To je pravděpodobně dáno tím, že nanášení a promývání peptidů probíhají po delší dobu a za stálého promíchávání.

Další parametr, který byl při izolaci fosforylovaných peptidů zjišťován, byla opakovatelnost. Tato veličina vyjadřuje procentuální zastoupení těch unikátních fosforylovaných peptidů, které byly izolovány v obou opakováních. Hodnoty opakovatelnosti pro dané varianty jsou shrnuty v Obrázku 13. Kyselina glutamová a kyselina mléčná sice dosahují ve vsádkovém uspořádání téměř 50% opakovatelnosti, v kolonkovém uspořádání ale jejich opakovatelnost nepřesahuje 21 %. Opakovatelnosti 30-40 % dosáhly kyselina glykolová a pufr bez aditivní kyseliny. Izolace se směsí

kyselin OSA, DHB, HFBA měla opakovatelnost 23 % ve vsádkovém a 36 % v kolonkovém uspořádání. Z těchto výsledků není jasné, zda a jak má přítomnost kompetitivní kyseliny vliv na opakovatelnost. Téměř u všech izolací (s výjimkou izolace se směsí kyselin) však byla pozorována vyšší opakovatelnost ve vsádkovém uspořádání. Lze se tedy domnívat, že způsob provedení metody izolace fosfopeptidů může mít vliv na opakovatelnost.



Obrázek 13 Opakovatelnost (%). Graf vyjadřuje procentuální zatoupení fosfopeptidů, které byly detekovány ve dvou nezávislých opakování současně.

ZÁVĚR

Proteinové fosforylace představují všudypřítomný biologický děj a v současné době je jejich analýze věnováno značné úsilí. Do popředí se v nedávné době dostaly analytické metody založené na MS. Jejich použití je značně ztíženo vzhledem ke skutečnosti, že hladiny fosforylovaných proteinů jsou udržovány ve velmi nízkých koncentracích. Z toho důvodu byly zavedeny prekoncentrační techniky, jejichž cílem je izolovat fosforylované proteiny/peptidy a usnadnit tak MS analýzu. Jednou z takových technik je afinitní chromatografie na oxidu titaničitém. Ta se ukázala být vysoce účinnou, přesto však stále limitovanou metodou obohacení fosforylovaných peptidů. Relativně nedávno bylo publikováno několik studií, které se věnují zvýšení selektivity vzhledem k fosfopeptidům. Z jejich výsledků vyplývá, že ke zvýšení selektivity do značné míry přispívá použití některých organických kyselin, které kompetují s nefosforylovanými peptidy.

Tato bakalářská práce (resp. její experimentální část) byla zaměřena na ověření účinnosti vybraných organických kyselin na izolaci fosforylovaných peptidů na oxidu titaničitém. Experimenty byly provedeny ve vsádkovém a kolonkovém uspořádání s kyselinou glykolovou, glutamovou, mléčnou a směsí kyselin OSA, DHB a HFBA. S přihlédnutím na diskutované výsledky byla pro vypracování pracovního protokolu zvolena izolace v kolonkovém uspořádání za použití pufracího systému s kyselinou glutamovou. Na tomto místě je nutné zmínit, že účinnost selektivního obohacení peptidů není dána jen přidavkem aditivní organické kyseliny, ale podílí se na ní řada dalších parametrů. Objem pufru, ve kterém jsou fosfopeptidy nanášeny na kolonu s oxidem titaničitým nebo doba jejich průtoku kolonou jsou jedny z možných faktorů, které mohou mít vliv na výsledek izolace fosforylovaných peptidů. Bylo prokázáno, že také koncentrace TFA a koncentrace aditivní kyseliny ovlivňují výtěžek a selektivitu (Kettenbach a Gerber 2011). V neposlední řadě je podstatný také vzájemný poměr nanášených peptidů a oxidu titaničitého (Kettenbach a Gerber 2011; Li *et al.* 2009). Vliv klíčových parametrů na výsledek selektivního obohacení fosforylovaných peptidů s využitím kyseliny glutamové a optimalizace pracovního protokolu jsou nyní inspirací pro budoucí studium.

V nedávné době se objevily práce, které se zabývají globální analýzou fosforylací v souvislosti s buněčnou signalizací a rostlinnými hormony (Heintz *et al.* 2006; Černý *et al.* 2011; Henrichs *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2013). Na Oddělení

biochemie proteinů a proteomiky Centra Regionu Haná se toto téma aktuálně řadí mezi hlavní výzkumné cíle a její zájem je obrácen směrem ke globální fosfoproteomice. Poznatky získané v této bakalářské práci proto mohou být použity pro analýzu proteinových fosforylací a přispět tak k dalšímu rozvoji zde vykonávané fosfoproteomiky.

SEZNAM ZKRATEK

AA	kyselina octová
ACN	acetonitril
ATP	adenosin trifosfát
BSA	bovinní sérový albumin
CFTR	transmembránový regulátor cystické fibrózy
CID	disociace indukovaná kolizí
DHB	kyselina 2,5-dihydroxybenzoová
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ERLIC	kapalinová chromatografie s hydrofilní interakcí a elektrostatickou repulzí
ESI	ionizace elektrosprejem
ETD	disociace elektronovým transferem
FA	kyselina mravenčí
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
HCD	vysokoenergetická C-trap disociace
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
HFBA	kyselina heptafluoromáselná
HILIC	kapalinová chromatografie s hydrofilní interakcí
IAM	iodacetamid
IEF	izoelektrická fokusace
IMAC	afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MSA	vícestupňová aktivace
nLC	nanokapilární kapalinová chromatografie
OSA	kyselina 1-oktansulfonová
PAC	fosforamidátová chemická derivatizace
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid

Q-TOF	hybridní tandemový hmotnostní spektrometr s kvadrupólovým analyzátozem a analyzátozem doby letu
RP-C18	reverzní fáze C18
SAX	iontově výměnná chromatografie na silném anexu
SIMAC	afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů se sekvenční elucí
SCX	iontově výměnná chromatografie na silném katexu
SDS	dodecylsulfát sodný
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEAB	bikarbonát triethylamonný
TFA	kyselina trifluoroctová
TPP	program Trans-Proteomic Pipeline

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Alpert AJ. Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides. *Anal Chem.* 2008 Jan 1; 80(1):62-76.

Amanchy R, Kalume DE, Iwahori A, Zhong J, Pandey A. Phosphoproteome analysis of HeLa cells using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). *J Proteome Res.* 2005 Sep-Oct; 4(5):1661-71.

Andersson L, Porath J. Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe³⁺) affinity chromatography. *Anal Biochem.* 1986 Apr;154(1):250-4.

Anguenot R, Yelle S, Nguyen-Quoc B. Purification of tomato sucrose synthase phosphorylated isoforms by Fe(III)-immobilized metal affinity chromatography. *Arch Biochem Biophys.* 1999 May 1; 365(1):163-9.

Aryal UK, Ross AR. Enrichment and analysis of phosphopeptides under different experimental conditions using titanium dioxide affinity chromatography and mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2010 Jan; 24(2):219-31.

Baker CL, Kettenbach AN, Loros JJ, Gerber SA, Dunlap JC. Quantitative proteomics reveals a dynamic interactome and phase-specific phosphorylation in the *Neurospora* circadian clock. *Mol Cell* 2009; 34:354–63.

Ballif BA, Villén J, Beausoleil SA, Schwartz D, Gygi SP. Phosphoproteomic analysis of the developing mouse brain. *Mol Cell Proteomics.* 2004 Nov; 3(11):1093-101.

Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villén J, Li J, Cohn MA, Cantley LC, Gygi SP. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Aug 17; 101(33):12130-5.

Bendt AK, Burkovski A, Schaffer S, Bott M, Farwick M, Hermann T. Towards a phosphoproteome map of *Corynebacterium glutamicum*. *Proteomics*. 2003 Aug; 3(8):1637-46.

Biemann K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed Environ Mass Spectrom*. 1988; 16:99-111.

Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001; 411:355-65.

Bodenmiller B, Mueller LN, Mueller M, Domon B, Aebersold R. Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome. *Nat Methods* 2007; 4:231-7.

Bodenmiller B, Mueller LN, Pedrioli PG, Pflieger D, Jünger MA, Eng JK, Aebersold R, Tao WA. An integrated chemical, mass spectrometric and computational strategy for (quantitative) phosphoproteomics: application to *Drosophila melanogaster* Kc167 cells. *Mol Biosyst*. 2007 Apr; 3(4):275-86.

Calvano CD, Jensen ON, Zamboni CG. Selective extraction of phospholipids from dairy products by micro-solid phase extraction based on titanium dioxide microcolumns followed by MALDI-TOF-MS analysis. *Anal Bioanal Chem*. 2009 Jul; 394(5):1453-61.

Cantin GT, Shock TR, Park SK, Madhani HD, Yates III JR. Optimizing TiO₂-based phosphopeptide enrichment for automated multidimensional liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2007; 79:4666-73.

Clevenger CV. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol*. 2004 Nov; 165(5):1449-60.

Connor PA, McQuillan AJ. Phosphate adsorption onto TiO₂ from aqueous solutions: an in situ internal reflection infrared spectroscopic study. *Langmuir* 1999; 15:2916-21.

Collins MO, Yu L, Choudhary JS. Analysis of protein phosphorylation on a proteome-scale. *Proteomics*. 2007 Aug; 7(16):2751-68.

Cosgrove MS, Boeke JD, Wolberger C. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Nov; 11(11):1037-43.

Covey T, Shushan B, Bonner R, Schroder W, Hucho F. *Methods in Protein Sequence Analysis.* (Jörnvall H, Höög JO, Gustavsson AM, eds.) Birkhäuser Press, Basel, Switzerland 1991; 249–256.

Černý M, Dyčka F, Bobál'ová J, Brzobohatý B. Early cytokinin response proteins and phosphoproteins of *Arabidopsis thaliana* identified by proteome and phosphoproteome profiling. *J Exp Bot.* 2011 Jan; 62(3):921-37

Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang CY, Krauss S, Ranger AM, Datta SR, Greenberg ME, Licklider LJ, Lowell BB, Gygi SP, Korsmeyer SJ. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature.* 2003 Aug 21; 424(6951):952-6.

Delcourt N, Thouvenot E, Chanrion B, Galeotti N, Jouin P, Bockaert J, Marin P. PACAP type I receptor transactivation is essential for IGF-1 receptor signalling and antiapoptotic activity in neurons. *EMBO J* 2007; 26:1542–51.

Deutsch EW, Lam H, Aebersold R. Data analysis and bioinformatics tools for tandem mass spectrometry in proteomics. *Physiol Genomics.* 2008 Mar 14; 33(1):18-25.

Dobson KD, McQuillan AJ. In situ infrared spectroscopic analysis of the adsorption of aromatic carboxylic acids to TiO₂, ZrO₂, Al₂O₃, and Ta₂O₅ from aqueous solutions. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2000; 56:557–65.

Engholm-Keller K, Hansen TA, Palmisano G, Larsen MR. Multidimensional Strategy for Sensitive Phosphoproteomics Incorporating protein prefractionation combined with SIMAC, HILIC, and TiO₂ chromatography applied to proximal EGF signaling *J Proteome Res.* 2011 Dec 2; 10(12):5383-97.

Engholm-Keller K, Larsen MR. Titanium dioxide as chemo-affinity chromatographic sorbent of biomolecular compounds-applications in acidicmodification-specific proteomics. *J Proteomics*. 2011 Dec 21; 75(2):317-28.

Engholm-Keller K, Birck P, Størling J, Pociot F, Mandrup-Poulsen T, Larsen MR. TiSH--a robust and sensitive global phosphoproteomics strategy employing a combination of TiO₂, SIMAC, and HILIC. *J Proteomics*. 2012 Oct 22; 75(18):5749-61.

Eyrich B, Sickmann A, Zahedi RP. Catch me if you can: Mass spectrometry-based phosphoproteomics and quantification strategies. *Proteomics*. 2011 Feb; 11(4):554-70.

Ficarro SB, McClelland ML, Stukenberg PT, Burke DJ, Ross MM, Shabanowitz J, Hunt DF, White FM. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*. 2002 Mar; 20(3):301-5.

Fischle W, Wang Y, Allis CD. Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature*. 2003 Oct 2; 425(6957):475-9.

Gaberc-Porekar V, Menart V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 2001 Oct 30; 49(1-3):335-60.

Good DM, Wirtala M, McAlister GC, Coon JJ. Performance characteristics of electron transfer dissociation mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2007 Nov; 6(11):1942-51.

Graham ME, Thaysen-Andersen M, Bache N, Craft GE, Larsen MR, Packer NH, Robinson PJ. A novel post-translational modification in nerve terminals: O-linked N-acetylglucosamine phosphorylation. *J Proteome Res*. 2011 Jun 3; 10(6):2725-33.

Graves JD, Krebs EG. Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol. Ther.* 1999; 82:111-21.

Grønborg M, Kristiansen TZ, Stensballe A, Andersen JS, Ohara O, Mann M, Jensen ON, Pandey A. 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. *Mol Cell Proteomics*. 2002 Jul; 1(7):517-27.

Han G, Ye M, Zhou H, Jiang X, Feng S, Jiang X, Tian R, Wan D, Zou H, Gu J. Large-scale phosphoproteome analysis of human liver tissue by enrichment and fractionation of phosphopeptides with strong anion exchange chromatography. *Proteomics*. 2008 Apr; 8(7):1346-61.

Harada H, Becknell B, Wilm M, Mann M, Huang LJ, Taylor SS, Scott JD, Korsmeyer SJ. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase. *Mol Cell*. 1999 Apr; 3(4):413-22.

Heintz D, Erxleben A, High AA, Wurtz V, Reski R, Van Dorselaer A, Sarnighausen E. Rapid alteration of the phosphoproteome in the moss *Physcomitrella patens* after cytokinin treatment. *J Proteome Res*. 2006 Sep; 5(9):2283-93.

Henrichs S, Wang B, Fukao Y, Zhu J, Charrier L, Bailly A, Oehring SC, Linnert M, Weiwad M, Endler A, Nanni P, Pollmann S, Mancuso S, Schulz A, Geisler M. Regulation of ABCB1/PGP1-catalysed auxin transport by linker phosphorylation. *EMBO J*. 2012 Jun 29; 31(13):2965-80.

Hunter T, Sefton BM. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980 Mar; 77(3):1311-5.

Ikeguchi Y, Nakamura H. Determination of organic phosphates by column-switching high performance anion-exchange chromatography using online preconcentration on titania. *Anal Sci* 1997; 13:479-83.

Jensen ON. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Jun; 7(6):391-403.

Jensen SS, Larsen MR. Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007; 21:3635–45.

Kawahara M, Nakamura H, Nakajima T. Group separation of ribonucleosides and deoxyribonucleosides on a new ceramic titania column. *Anal Sci* 1989; 5:763-4.

Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem*. 2002 Oct 15; 74(20):5383-92.

Keller A, Eng J, Zhang N, Li XJ, Aebersold R. A uniform proteomics MS/MS analysis platform utilizing open XML file formats. *Mol Syst Biol*. 2005; 1:2005.0017.

Kettenbach AN, Gerber SA. Rapid and reproducible single-stage phosphopeptide enrichment of complex peptide mixtures: application to general and phosphotyrosine-specific phosphoproteomics experiments. *Anal Chem*. 2011 Oct 15; 83(20):7635-44.

Kimura Y, Shibasaki S, Morisato K, Ishizuka N, Minakuchi H, Nakanishi K, Matsuo M, Amachi T, Ueda M, Ueda K. Microanalysis for MDR1 ATPase by high-performance liquid chromatography with a titanium dioxide column *Anal Biochem*. 2004 Mar 15; 326(2):262-6.

Knight ZA, Schilling B, Row RH, Kenski DM, Gibson BW, Shokat KM. Phosphospecific proteolysis for mapping sites of protein phosphorylation. *Nat Biotechnol*. 2003 Sep; 21(9):1047-54.

Kokubu M, Ishihama Y, Sato T, Nagasu T, Oda Y. Specificity of immobilized metal affinity-based IMAC/C18 tip enrichment of phosphopeptides for protein phosphorylation analysis. *Anal Chem*. 2005 Aug 15;77(16):5144-54.

Kuroda I, Shintani Y, Motokawa M, Abe S, Furuno M. Phosphopeptide-selective column-switching RP-HPLC with a titania precolumn. *Anal Sci*. 2004 Sep;20(9): 1313-9.

Lai AC, Tsai CF, Hsu CC, Sun YN, Chen YJ. Complementary Fe(3+)- and Ti(4+)-immobilized metal ion affinity chromatography for purification of acidic and basic phosphopeptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2012 Sep 30; 26(18):2186-94.

Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON, Roepstorff P, Jørgensen TJ. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Jul;4(7): 873-86.

Lemeer S, Pinkse MW, Mohammed S, van Breukelen B, den Hertog J, Slijper M, Heck AJ. Online automated in vivo zebrafish phosphoproteomics: from large-scale analysis down to a single embryo. *J Proteome Res* 2008; 7:1555–64.

Li QR, Ning ZB, Tang JS, Nie S, Zeng R. Effect of peptide-to-TiO₂ beads ratio on phosphopeptide enrichment selectivity. *J Proteome Res*. 2009 Nov; 8(11):5375-81.

Loo MA, Jensen TJ, Cui L, Hou Y, Chang XB, Riordan JR. Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by proteasome. *EMBO J*. 1998 Dec 1; 17(23):6879-87.

Lowe JB. Glycosylation, immunity, and autoimmunity. *Cell*. 2001 Mar 23; 104(6):809-12.

Maccarrone G, Kolb N, Teplytska L, Birg I, Zollinger R, Holsboer F, Turck CW. Phosphopeptide enrichment by IEF. *Electrophoresis*. 2006 Nov; 27(22):4585-95.

MacDonald JA, Mackey AJ, Pearson WR, Haystead TA. A strategy for the rapid identification of phosphorylation sites in the phosphoproteome. *Mol Cell Proteomics*. 2002 Apr; 1(4):314-22.

Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem*. 2000 Mar 15; 72(6):1156-62.

Mallick P, Kuster B. Proteomics: a pragmatic perspective. *Nat Biotechnol*. 2010 Jul; 28(7):695-709.

Matsuda H, Nakamura H, Nakajima T. New ceramic titania – selective absorbent for organic-phosphates. *Anal Sci* 1990; 6:911-2.

Mazanek M, Mituloviae G, Herzog F, Stingl C, Hutchins JR, Peters JM, Mechtler K. Titanium dioxide as a chemo-affinity solid phase in offline phosphopeptide chromatography prior to HPLC-MS/MS analysis. *Nat Protoc.* 2007; 2(5):1059-69.

Mazanek M, Roitinger E, Hudecz O, Hutchins JR, Hegemann B, Mitulović G, Taus T, Stingl C, Peters JM, Mechtler K. A new acid mix enhances phosphopeptide enrichment on titanium- and zirconium dioxide for mapping of phosphorylation sites on protein complexes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010 Feb 15; 878(5-6):515-24.

McLachlin DT, Chait BT. Improved beta-elimination-based affinity purification strategy for enrichment of phosphopeptides. *Anal Chem.* 2003 Dec 15; 75(24):6826-36.

McNulty DE, Annan RS. Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection. *Mol Cell Proteomics.* 2008 May; 7(5):971-80.

Molina H, Horn DM, Tang N, Mathivanan S, Pandey A. Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:2199–204.

Neville DC, Rozanas CR, Price EM, Gruis DB, Verkman AS, Townsend RR. Evidence for phosphorylation of serine 753 in CFTR using a novel metal-ion affinity resin and matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Protein Sci.* 1997 Nov; 6(11):2436-45.

Oda Y, Nagasu T, Chait BT. Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. *Nat Biotechnol.* 2001 Apr; 19(4):379-82.

Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*. 2006 Nov 3; 127(3):635-48.

Olsen JV, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat Methods*. 2007 Sep; 4(9):709-12.

Palumbo AM, Smith SA, Kalcic CL, Dantus M, Stemmer PM, Reid GE. Tandem mass spectrometry strategies for phosphoproteome analysis. *Mass Spectrom Rev*. 2011 Jul-Aug; 30(4):600-25.

Pinkse MW, Uitto PM, Hilhorst MJ, Ooms B, Heck AJ. Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns. *Anal Chem*. 2004 Jul 15;76(14): 3935-43.

Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc*. 2007;2(8):1896-906.

Raus M, Kopečný D, Šebela M. Program application for the prediction of results of protein digestion by proteolytic enzymes. *Chemické listy*. 2013; 107:44-53

Riordan JR. Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol*. 2005; 67:701-18.

Roepstorff P, Kristiansen K. The use of Edman degradation in peptide mixture analysis by mass spectrometry. *Biomed Mass Spectrom*. 1974 Aug; 1(4):231-6.

Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom*. 1984 Nov; 11(11):601.

Rush J, Moritz A, Lee KA, Guo A, Goss VL, Spek EJ, Zhang H, Zha XM, Polakiewicz RD, Comb MJ. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol.* 2005 Jan; 23(1):94-101.

Schroeder MJ, Shabanowitz J, Schwartz JC, Hunt DF, Coon JJ. A neutral loss activation method for improved phosphopeptide sequence analysis by quadrupole ion trap mass spectrometry. *Anal Chem.* 2004 Jul 1; 76(13):3590-8.

Seward, R. J., Perlman, D. H., Berg, E. A., Hu, J., Costello, C. E., Methyl esterification of peptides prior to immobilized metal-ion affinity chromatography: determination of optimal time course and side products. *Abstract presented at 52nd ASMS conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, Tennessee 2004.*

Speicher KD, Kolbas O, Harper S, Speicher DW. Systematic analysis of peptide recoveries from in-gel digestions for protein identifications in proteome studies. *J Biomol Tech.* 2000 Jun; 11(2):74-86.

Steen H, Kuster B, Fernandez M, Pandey A, Mann M. Tyrosine phosphorylation mapping of the epidermal growth factor receptor signaling pathway. *J Biol Chem.* 2002 Jan 11; 277(2):1031-9.

Stensballe A, Jensen ON. 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 Commun Mass Spectrom.* 2004; 18(15):1721-30.

Stewart II, Thomson T, Figeys D. O¹⁸O Labeling: a tool for proteomics. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2001; 15(24):2456-65.

Sugiyama N, Masuda T, Shinoda K, Nakamura A, Tomita M, Ishihama Y. Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6:1103-9.

Syka JE, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:9528–9533.

Tao WA, Wollscheid B, O'Brien R, Eng JK, Li XJ, Bodenmiller B, Watts JD, Hood L, Aebersold R. Quantitative phosphoproteome analysis using a dendrimer conjugation chemistry and tandem mass spectrometry. *Nat Methods*. 2005 Aug; 2(8):591-8.

Tani K, Ozawa M. Investigation of chromatographic properties of titania. I. On retention behavior of hydroxy and other substituent aliphatic carboxylic acids: Comparison with zirconia. *J Liquid Chromatogr Relat Technol* 1999; 22:843–56.

Thingholm TE, Jensen ON, Robinson PJ, Larsen MR. SIMAC - A phosphoproteomic strategy for the rapid separation of mono-phosphorylated from multiply phosphorylated peptides. *Mol Cell Proteomics*. 2008 Apr; 7(4):661-71.

Thingholm TE, Jensen ON, Larsen MR. Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics*. 2009 Mar; 9(6):1451-68.

Timm W, Ozlu N, Steen JJ, Steen H. Effect of highaccuracy precursor masses on phosphopeptide identification from MS3 spectra. *Anal Chem*. 2010; 82:3977–80.

Trinidad JC, Specht CG, Thalhammer A, Schoepfer R, Burlingame AL. Comprehensive identification of phosphorylation sites in postsynaptic density preparations. *Mol Cell Proteomics*. 2006 May; 5(5):914-22.

Tsai CF, Wang YT, Chen YR, Lai CY, Lin PY, Pan KT, Chen JY, Khoo KH, Chen YJ. Immobilized metal affinity chromatography revisited: pH/acid control toward high selectivity in phosphoproteomics. *J Proteome Res*. 2008 Sep; 7(9):4058-69.

Ulantz PJ, Yocum AK, Bodenmiller B, Aebersold R, Andrews PC, Nesvizhskii AI. Comparison of MS(2)-only, MSA, and MS(2)/MS(3) methodologies for phosphopeptide identification. *J Proteome Res*. 2009 Feb; 8(2):887-99.

- Villén J, Beausoleil SA, Gerber SA, Gygi SP. Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 Jan 30; 104(5):1488-93.
- Walther TC, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol*. 2010 Aug 23; 190(4):491-500.
- Washburn MP, Wolters D, Yates JR 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*. 2001 Mar; 19(3):242-7.
- Wilson-Grady JT, Villen J, Gygi SP. Phosphoproteome analysis of fission yeast. *J Proteome Res* 2008; 7:1088–97.
- Wu J, Shakey Q, Liu W, Schuller A, Follettie MT. Global profiling of phosphopeptides by titania affinity enrichment. *J Proteome Res*. 2007 Dec; 6(12):4684-9.
- Ye J, Zhang X, Young C, Zhao X, Hao Q, Cheng L, Jensen ON. Optimized IMAC-IMAC protocol for phosphopeptide recovery from complex biological samples. *J Proteome Res*. 2010 Jul 2; 9(7):3561-73.
- Zhang H, Zha X, Tan Y, Hornbeck PV, Mastrangelo AJ, Alessi DR, Polakiewicz RD, Comb MJ. Phosphoprotein analysis using antibodies broadly reactive against phosphorylated motifs. *J Biol Chem*. 2002 Oct 18; 277(42):39379-87.
- Zhang H, Zhou H, Berke L, Heck AJ, Mohammed S, Scheres B, Menke FL. Quantitative phosphoproteomics after auxin-stimulated lateral root induction identifies an SNX1 protein phosphorylation site required for growth. *Mol Cell Proteomics*. 2013 May; 12(5):1158-69.
- Zhou H, Watts JD, Aebersold R. A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation. *Nat Biotechnol*. 2001; 19:375–8.

Zhou H, Ye M, Dong J, Han G, Jiang X, Wu R, Zou H. Specific phosphopeptide enrichment with immobilized titanium ion affinity chromatography adsorbent for phosphoproteome analysis. *J Proteome Res.* 2008 Sep; 7(9):3957-67.

Zhou H, Ye M, Dong J, Corradini E, Cristobal A, Heck AJ, Zou H, Mohammed S. Robust phosphoproteome enrichment using monodisperse microsphere-based immobilized titanium (IV) ion affinity chromatography. *Nat Protoc.* 2013 Mar; 8(3):461-80.

Zhu X, Lee HG, Raina AK, Perry G, Smith MA. The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals* 2002; 11:270–81.

Zubarev RA, Horn DM, Fridriksson EK, Kelleher NL, Kruger NA, Lewis MA, Carpenter BK, McLafferty FW. Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations. *Anal Chem.* 2000 Feb 1; 72(3):563-73.

<http://biochemie.upol.cz/software/proteincutter/>

<http://dbptm.mbc.nctu.edu.tw/>

PŘÍLOHY

Příloha 1: Pracovní protokol pro separaci fosfopeptidů afinitní chromatografií na oxidu titaničitým v kolonkovém uspořádání

Materiál a nástroje:

Pipeta Eppendorf Research 1-10 μl , pipeta Eppendorf Research 10-100 μl , pipeta Eppendorf Research 100-1000 μl , příslušné špičky (Eppendorf), špičky GELoader 0,5-20 μl (Eppendorf), Hamiltonovy jehla (průměr 22G), mikrozkušavky (Eppendorf).

Přístrojové vybavení:

Sonifikační lázeň Kraintek, Eppendorf Concentrator Plus, centrifuga IEC CL31R Multispeed, Vortex mixer Stuart SA8

Roztoky:

Nanášecí pufr: 2% TFA, 65% ACN, saturovaná kyselina glutamová ($25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)

Promývací pufr 1: 0,5% TFA, 65% ACN

Promývací pufr 2: 0,1% TFA, 65% ACN

Eluční pufr 1: 1% NH_4OH , 40% ACN

Eluční pufr 2: 1% NH_4OH , 40% ACN, 50mM ATP

Postup:

Příprava vzorku:

1. Do vialky obsahující peptidy komplexního lyzátu (110 μg) přidat 55 μl nanášecího pufru (cca $2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
2. 10 minut sonikovat
3. 10 minut vortexovat
4. Krátce centrifugovat

Příprava a ekvilibrace TiO_2 Stage Tips:

1. Z 3M Empore disku C8 vyseknout jehlou o průměru 22G fritku a vpravit ji do zastřižené GE Loader špičky. Špičku upevnit do 1,5ml mikrozkušavky
2. Do 2ml mikrozkušavky odvážit 5 mg Titansphere TiO_2
3. Přidat 1 ml 100% ACN a pipetováním rozsuspendovat

4. 5 minut sonikovat
5. 5 minut vortexovat a okamžitě přepipetovat 50 μl suspenze (250 μg) do připravené GE Loader špičky s fritkou
6. Centrifugovat 2 minuty, 3000 rpm, 25 °C
7. Do špičky nanést 20 μl nanášecího pufu
8. Centrifugovat 2 minuty, 3000 rpm, 25 °C
9. Do špičky nanést dalších 20 μl nanášecího pufu
10. Centrifugovat 2 minuty, 3000 rpm, 25 °C

Nanesení vzorku a promývání:

1. Kolonku upevnit do čisté 1,5ml mikrozkušavky
2. Na TiO_2 nanést 25 μl vzorku (50 μg peptidů na 250 μg TiO_2 ; poměr 1:5)
3. Centrifugovat 5 minut, 2000 rpm, 25 °C
4. Nanést 20 μl nanášecího pufu
5. Centrifugovat 2 minuty, 3000 rpm, 25 °C
6. Nanést 20 μl promývacího pufu 1
7. Centrifugovat 2 minuty, 3000 rpm, 25 °C
8. Nanést 20 μl promývacího pufu 2
9. Centrifugovat 2 minuty, 3000 rpm, 25 °C
10. Nanést 20 μl 40% ACN
11. Centrifugovat 2 minuty, 2000 rpm, 25 °C

Eluce:

1. Špičku s TiO_2 upevnit do čisté 1,5ml mikrozkušavky obsahující 10 μl 25% FA
2. Na TiO_2 kolonku nanést 20 μl elučního pufu 1
3. Centrifugovat 5 minut, 2000 rpm, 25 °C
4. Na TiO_2 kolonku nanést 20 μl elučního pufu 2
5. Centrifugovat 5 minut, 2000 rpm, 25 °C
6. Eluát odpařit ve vakuové odparce při 30 °C na cca 2 μl koncentrátu (doba cca 30 minut)
7. Provést přečištění eluátu na C18 Stage Tips