

# Analýza změn fosfoproteomu nádorové buněčné linie MDA-MB-468 v odpovědi na expresi izoformem p63 pomocí hmotnostní spektrometrie

## Analysis of Phosphoproteome Changes in MDA-MB-468 Cancer Cell Line in Response to Expression of p63 Isoforms Using Mass Spectrometry

Dvořáková P., Nekulová M., Holčáková J., Vojtěšek B., Hernychová L.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

Nádorové buňky se od buněk normální tkáně liší mimo jiné aktivací různých signálních drah. Tyto změny jsou podmíněny odlišnou aktivitou kináz a fosfatáz způsobujících rozdíly ve fosforylaci proteinů. Detekce těchto změn je zásadní pro cílenou léčbu zaměřenou na inhibici nebo aktivaci konkrétních signálních drah. Existují různé metody, kterými lze fosforylaci proteinů stanovit. Jednou z vhodných metod schopných charakterizovat fosfoproteom je hmotnostní spektrometrie. Tento článek je zaměřen na analýzu změn ve fosfoproteomu buněčné linie MDA-MB-468 odvozené od nádoru prsu s vnesenými geny kódujícími izoformy proteinu p63. Buňky s tetracyklinem indukovanou expresí izoformem proteinu p63 byly srovnány s kontrolními buňkami s přirozenou expresí p63. Denaturované proteiny z buněčného lysátu byly nejprve enzymaticky štěpeny na peptidy a následně obohaceny o fosfopeptidy. Měření probíhalo pomocí kapalinového chromatografu spojeného s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite. Každý vzorek byl analyzován třemi různými hmotnostně spektrometrickými metodami s cílem najít nejvhodnější podmínky pro detekování fosforylovaných peptidů. Z naměřených dat pak byly identifikovány a kvantifikovány fosfoproteiny. Počet fosfoproteinů identifikovaných jednotlivými hmotnostně spektrometrickými metodami byl srovnatelný, avšak každou metodou bylo získáno několik unikátních fosforylovaných proteinů. Analýzou získaných dat bylo zjištěno, že v buňkách MDA-MB-468 obě izoformy proteinu p63 (TAp63a a ΔNp63a) ovlivňují zejména fosforylaci proteinů odpovědných za sestřih RNA.

### Klíčová slova

hmotnostní spektrometrie – fosfoproteiny – signální dráhy – izoformy p63 – rakovina prsu

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), projektem MŠMT – NPU I – LO1413, MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805), IGA NT/14602-3/2013 a BBMRI\_CZ (LM2010004).

This study was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101), by the project MEYS – NPS I – LO1413, by MH CZ – DRO (MMCI, 002 09805), by IGA NT/14602-3/2013 and BBMRI\_CZ (LM2010004).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Ing. Petra Dvořáková, Ph.D.  
Regionální centrum aplikované  
molekulární onkologie  
Masarykův onkologický ústav  
Žlutý kopec 7  
656 53 Brno  
e-mail: petra.dvorakova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 9. 4. 2015

Přijato/Accepted: 20. 7. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20152511>

## Summary

Compared to normal cells, tumor cells can show different activity of kinases and phosphatases resulting in altered phosphorylation states of proteins affecting their activity within various signaling pathways. The detection of these alterations is essential for development of targeted therapy based on activation/inhibition of specific signaling pathways. Various methods can be used for detection of protein phosphorylation; however, a comprehensive assessment of phosphoproteome is performed by mass spectrometry. The differences in phosphoproteome were studied using MDA-MB-468 cell line (with incorporated genes encoding isoforms of p63) derived from breast carcinoma. Cells with tetracycline-induced expression of the p63 isoforms were compared to control cells with wild-type expression. Denatured proteins from cell lysates were digested to peptides, enriched for phosphopeptides and subsequently separated using liquid chromatograph coupled with mass spectrometer Orbitrap Elite. Three different mass spectrometric methods were used for each sample analysis to find the most suitable conditions for the detection of phosphorylated peptides. Then phosphoproteins were identified and quantified. The number of identified phosphoproteins using all chosen mass spectrometric methods was similar; however, each method showed several unique phosphorylated proteins. Our analysis revealed that both p63 isoforms (TAp63 $\alpha$  a  $\Delta$ Np63 $\alpha$ ) mainly affected phosphorylation of proteins associated with RNA splicing in MDA-MB-468 cells.

## Key words

mass spectrometry – phosphoproteins – signaling pathways – p63 isoforms – breast cancer

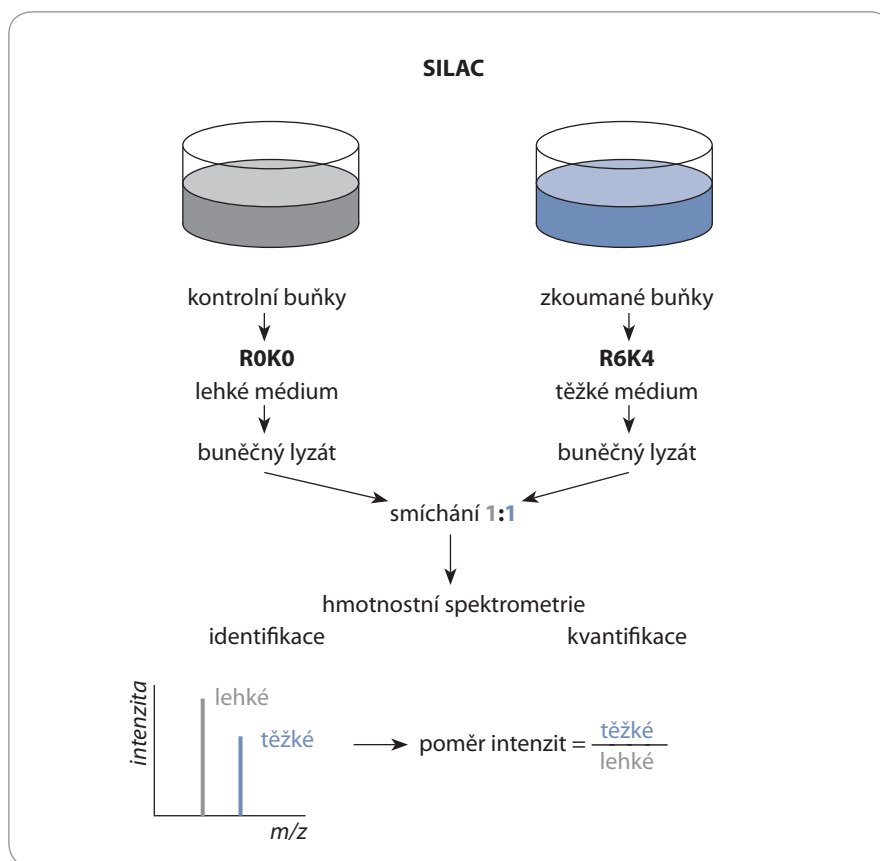
## Úvod

Fosforylace proteinů je jedna z nejrozšířenějších kovalentních posttranslačních modifikací [1] a hraje klíčovou úlohu v regulaci buněčných signálních drah. Proteiny jsou v buňce fosforylovány prostřednictvím proteinových kináz, které katalyzují přenos fosfátové skupiny z adenosintrifosfátu na serin, treonin a tyrozin, k defosforylaci proteinů pak dochází prostřednictvím proteinových fosfatáz. Onkologická onemocnění jsou často spojena s chybnou funkcí proteinových kináz či fosfatáz a místa fosforylací bývají v nádorových buňkách mutována [2]. Fosforylace se rovněž podílí na regulaci proliferace nádorové buňky, signalizaci onkogenních kináz, regulaci transkripce genů a aktivity nádorového supresoru p53 a mnoha dalších proteinů. Kontrola hladiny fosforylace různých proteinů je proto cílem protinádorové terapie, která využívá především různé tyrozinkinázové inhibitory, jako je např. gefitinib, imatinib, sorafenib atd. [3].

K identifikaci a kvantifikaci změn fosforylace proteinů je možné využít různé metody a přístupy. Vhodný je test kinázové aktivity *in vitro* v přítomnosti substrátu a adenosintrifosfátu. Další možností je inkubování buněk s radioaktivně značeným <sup>32</sup>P-ortofosfátem s následnou separací získaných proteinů pomocí gelové elektroforézy. Lze také použít metody založené na existenci fosfo-spezifických protilátek, jako je imunoblot, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) a průtoková cytometrie. Úspěšná

detekce fosfoproteinů je však závislá na specifitě a afinitě protilátky a také na její komerční dostupnosti.

Moderní metoda, pomocí které je možné změny ve fosfoproteomu posoudit komplexně, je hmotnostní spek-



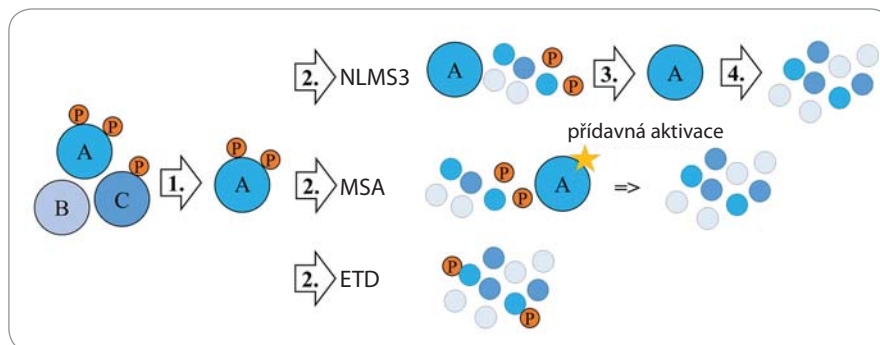
Obr. 1. Metabolické značení aminokyselin se aplikuje na živé buněčné kultury.

Dochází k inkorporaci těžkých aminokyselin lyzinu a argininu (jejichž hmota je díky izotopům uhlíku a dusíku navýšena – v případě lyzinu o 4, argininu o 6 Da) obsažených v těžkém médiu (R6K4) do nově syntetizovaných proteinů. Zároveň se kultivují buňky v lehkém médiu (R0K0) bez těžkých aminokyselin, které slouží jako kontrola. Následně se buněčné lyzáty smíchávají v poměru 1 : 1 (lehké : těžké). Identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie se získají údaje ohledně intenzit analytů (zvláště pro kontrolu a zvláště pro zkoumaný vzorek). Poměrem intenzit se pak určí relativní kvantifikace proteinů ve vzorcích.

trometrie. Lze ji využít pro identifikaci fosfoproteinů i pro kvantifikaci změn ve fosfoproteomu. K tomu jsou využívány speciální techniky, mezi něž patří metabolické značení aminokyselin aplikované na živé buněčné kultury (stable isotope labeling with aminoacids in cell culture – SILAC) [4], nebo izotopické či izobarické značení peptidů [5,6]. Při SILAC jsou během kultivace do nově syntetizovaných proteinů inkorporovány aminokyseliny značené stabilními izotopy lyzinu a argininu, paralelně jako kontrola jsou kultivovány buňky v lehkém médiu s přirozeně se vyskytujícími aminokyselinami (obr. 1).

Z důvodu výskytu nízké koncentrace fosforylovaných proteinů v buňkách je nutné použít metodu, která specificky tyto proteiny zakoncentruje. Existuje celá řada přístupů, kterými lze obohatení provést, a to na úrovni proteinů či peptidů [7]. Obvykle se používají techniky pro obohacování fosfopeptidů, kdy je nejprve směs proteinů proteolyticky štěpena a vzniklé peptidy jsou následně obohaceny o fosforylované formy. Nejčastěji se volí obohacování fosfopeptidů oxidem titaničitým ( $\text{TiO}_2$ ) [8] nebo chelatační afinitní chromatografie (immobilized metal ion affinity chromatography – IMAC) [9]. Při  $\text{TiO}_2$  obohacování se fosforylované peptidy v kyselém prostředí navazují na  $\text{TiO}_2$  částice přes svou fosfátovou OH-skupinu a po odstranění nefosforylovaných peptidů jsou z částic uvolněny změnou pH. V případě IMAC se záporně nabitě fosfopeptidy navazují na ionty kovů chelátované na částice pokryté nitrilotriocetovou nebo iminodiacetovou kyselinou.

Detekce fosfopeptidů může být provedena různými typy hmotnostních spektrometrů (mass spectrometer – MS). MS zaznamená efektivní hmotu fosfopeptidu (poměr hmotnosti a náboje,  $m/z$ ), jež je navýšena o fosfátový zbytek (98 Da, 80 Da) [10]. Pomocí tandemového hmotnostního spektrometru (MS/MS) lze kromě identifikace určit i přesnou aminokyselinu, která byla fosforylována. Pro vznik fragmentačních spekter je třeba detekovaný fosfopeptid (prekurzor) izolovat a následně jej fragmentovat na menší ionty (obr. 2). Fragmentace bývá nejčastěji uskuteč-



**Obr. 2.** Zjednodušené schéma metod, které se používají pro analýzu fosforylovaných peptidů MS.

Ze směsi detekovaných peptidů/fosfopeptidů je jeden izolován a následně fragmentován. V případě MSA a NLM3S3 metody je použita CID fragmentace, při které dochází ke ztrátě fosfoskupiny navázané na serinu či treoninu. Vzniklé fragmenty obsahují fragment neutrální ztráty, který je v případě metody MSA fragmentován pomocí přidavné fragmentace. Metoda NLM3S3 fragment neutrální ztráty izoluje a fragmentuje zvlášť. Při ETD fragmentaci nedochází ke ztrátě fosforylace a lze tak přímo identifikovat fosforylace.

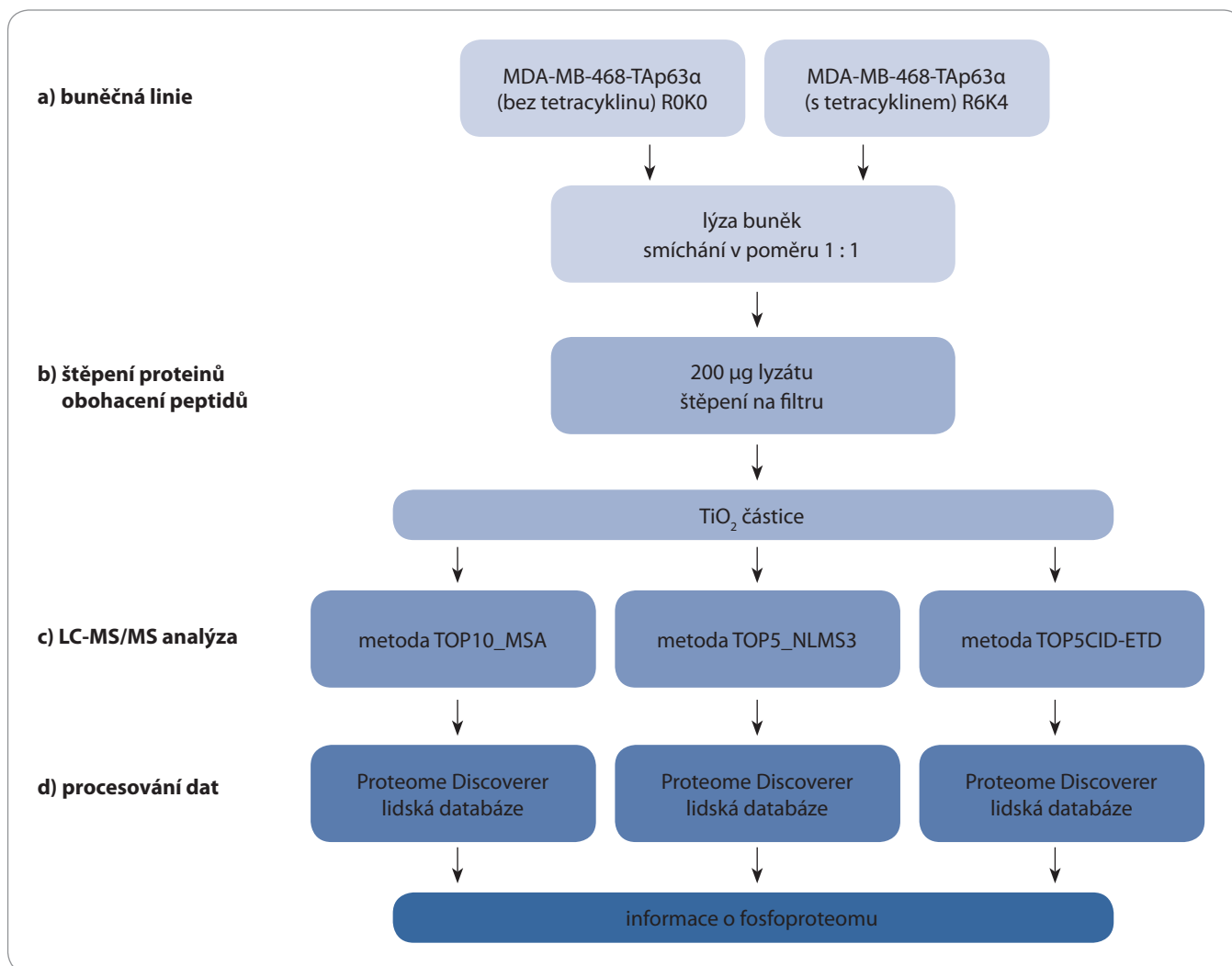
něna pomocí kolize iontů peptidů s molekulami plynu (collision induced dissociation – CID), při níž fosfopeptidy ztrácí fosfoskupinu (fragment neutrální ztráty) [11]. Měří se tedy sken neutrálních ztrát (neutral loss – NLM3S3), kdy je fragmentační spektrum použito pro identifikování fragmentu neutrální ztráty. Tento fragment je izolován a znovu fragmentován [12]. Je také možné využít vícestupňovou aktivaci (multistage activation – MSA), při které jsou prekurzorový ion a ionty neutrálních ztrát fragmentovány dohromady. Dalším vhodným typem je fragmentace, při níž kladně nabitý peptid reaguje s elektrony např. s fluoranthenovým aniontem (electron transfer dissociation – ETD). Nedochází při ní ke ztrátě fosforylace, a tudíž mohou být přímo identifikovány [12].

Před MS je vhodné předřadit kapalinovou chromatografii, díky které dochází ke snížení komplexity vzorku. Směs fosfopeptidů je nejprve zachycena na analytické koloně a poté jsou fosfopeptidy postupně eluovány z kolony přímo do MS.

Naměřená data musí být hodnocena pomocí speciálních programů – fosfoproteomika využívá programy MaxQuant [13] nebo Proteome Discoverer s algoritmem PhosphoRS 3.1 [14] predikující lokalizaci fosforylovaných míst. Spektra získaná MS/MS analýzou jsou pomocí vyhledávacích algoritmů (Mascot, Sequest) porovnávána s proteinovou da-

tabází, při kvantitativních studiích je navíc určena změna fosforylace oproti kontrolnímu vzorku a celkové expresi proteinu. Proteiny vykazující signifikantní kvantitativní změny se mohou za pomoci speciálních programů, např. Ingenuity Pathway Analysis, David, PathVisio, využít ke studiu signálních drah [15].

Analýza fosfoproteomu byla provedena v buněčné linii MDA-MB-468 s indukibilní expresí N-koncových izoform proteinu p63 (TAp63a a  $\Delta\text{Np63a}$ ), které se od sebe liší přítomností N-koncové transaktivační domény. Linie MDA-MB-468 je odvozena od nádoru prsu bazálního typu a vykazuje triple-negativní fenotyp, tj. je negativní pro estrogenový a progesteronový receptor a bez zvýšené hladiny Her2. Do této linie byly vneseny geny kódující izoformy proteinu p63, TAp63a nebo  $\Delta\text{Np63a}$ , jejichž exprese je indukovatelná tetracyklinem. Protein p63 má zásadní význam v průběhu ontogeneze epiteliálních struktur včetně mléčné žlázy a jeho hladina je často zvýšená u spinocelulárních karcinomů [16–18]. V případě karcinomu prsu byla popsána exprese proteinu p63 u jeho bazálního typu, který je často spojen s triple-negativním fenotypem [19]. Buněčná linie MDA-MB-468 je proto vhodným modelem pro studium funkce izoform p63 u karcinomu prsu. Protein p63 plní funkci transkripčního faktoru a v nádorové buňce je zapojen do mnoha sig-



Obr. 3. Schéma experimentu pro buněčnou linii MDA-MB-468-TAp63a.

Buněčná linie byla kultivována bez tetracyklinu (kontrola) nebo s přidavkem antibiotika. Buněčné lyzáty z těchto buněčných kultur byly smíchány. Denaturované proteiny byly štěpeny na peptidy, které byly pomocí  $\text{TiO}_2$  částic obohaceny o fosfopeptidy. Měření probíhalo pomocí LC-MS/MS třemi různými metodami. Z každého měření byla získána unikátní data, která byla zvlášť zpracována. Stejným způsobem byly analyzovány vzorky buněčné linie MDA-MB-468- $\Delta\text{Np63a}$  a MDA-MB-468-pcDNA6/TR.

nálních drah, např. EGFR (epidermal growth factor receptor), FGFR (fibroblast growth factor receptor), Wnt/ $\beta$ -catenin, Notch a dalších [20–22]. Předpokládá se tedy, že výrazně ovlivňuje i fosfoproteom nádorové buňky. Izoforma TAp63a plní funkce nádorového supresoru a inhibitoru metastazování [23,24]. Izoforma  $\Delta\text{Np63a}$  byla původně považována pouze za dominantně negativní inhibitor aktivity TAp63a a případně i dalších členů rodiny p53 [25], dnes je však známo, že je také schopna aktivovat transkripci cílových genů [26].

Cílem této práce je nalezení optimální metody pro detekování fosfory-

lovaných proteinů ve výše popsané buněčné linii a zároveň zjistit změny ve fosfoproteomu.

#### Materiál a metody

V rámci studie byly porovnány fosfoproteiny buněk MDA-MB-468 s indukci a bez indukce exprese izoformou p63 (TAp63a a  $\Delta\text{Np63a}$ ) pomocí tetracyklinu. Buněčné lyzáty byly po změření koncentrace smíchány, denaturované proteiny štěpeny a peptidy obohaceny o fosfopeptidy pomocí  $\text{TiO}_2$ . Takto připravené vzorky (celkem tři) byly změřeny třemi různými hmotnostně spektrometrickými metodami s předřazenou

kapalinovou chromatografií (LC-MS/MS). Získaná data z každého měření byla zpracována zvlášť pomocí programu Proteome Discoverer (obr. 3).

#### Buněčná linie

Buněčné linie MDA-MB-468- $\Delta\text{Np63a}$  a MDA-MB-468-TAp63a obsahují stabilně inkorporovaný gen kódující danou izoformu proteinu p63 pod kontrolou cytomegalovirového (CMV) promotoru, jehož exprese je inhibována vazbou tetracyklinového represoru. Přidání tetracyklinu do kultivačního média má za následek zablokování vazby represoru a tím spuštění transkripce příslušného genu.

**Tab. 1. Počty identifikovaných proteinových skupin z jednotlivých analýz.**

Tabulka uvádí hodnoty pro každou metodu zvlášť a zároveň i celkový počet proteinových skupin identifikovaných ze všech tří analýz dohromady.

MS/MS metoda	MDA-MB-468-ΔNp63α		MDA-MB-468-TAp63α		MDA-MB-468-pcDNA6/TR	
	proteinové skupiny		proteinové skupiny		proteinové skupiny	
CID_MSA	682	910	799	1 085	787	1 062
CID_NLMS3	744		893		869	
CID_ETD	683		823		801	

Jako kontrolní linie byly použity buňky MDA-MB-468-pcDNA6/TR, které jsou mateřskou linií výše zmíněných dvou linií a exprimují pouze tetracyklinový represor. Buňky byly kultivovány za standardních podmínek v DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) obohaceném o 10% fetální bovinní sérum (HyClone, Thermo Scientific, USA). Pro kvantifikaci byla použita metoda SILAC: buňky byly kultivovány v DMEM obsahujícím neznačené aminokyseliny (R0K0) a v médiu se značenými aminokyselinami (R6K4) (Dundee Cell Products, UK), s přidavkem 200 mg/l L-prolinu. K buňkám v DMEM R6K4 byl na 24 hod přidán tetracyklin v koncentraci 1 µg/ml. Buňky (dvě misky o průměru 10 cm) byly lyzovány v pufru obsahujícího 8 M močovinu (Sigma Aldrich, USA), 40 mM NaCl (Lach:ner, ČR), 50 mM tris(hydroxymetyl)aminometan (Bio-Rad, USA), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich, USA) s přidavkem inhibitoru fosfatáz a proteáz. Koncentrace proteinů byla změřena metodou dle Bradfordové. Lyzáty o stejné koncentraci celkového proteinu byly následně smíchány v poměru 1 : 1 (w/w).

#### Štěpení proteinů na peptidy a jejich následné obohacení o fosfopeptidy

Na přípravu každého vzorku bylo použito 200 µg celkového denaturovaného proteinu. Štěpení probíhalo na filtru FASP (filter aided sample preparation) [27] za použití trypsinu. Centrifugací byla směs peptidů uvolněna z filtru, odpařena do sucha a poté obohacena o fosfopeptidy pomocí TiO<sub>2</sub> částic (GL Sciences, Japan) [28]. Vzorky následně odpařené do sucha byly ihned analyzovány pomocí MS.

**Tab. 2. Výsledky analýzy genové ontologie.**

Jsou uvedeny jednotlivé klastry, seřazené podle významnosti (enrichment score).

MDA-MB-468-TAp63α	enrichment score
<b>Genová ontologie – biologický proces</b>	
sestřih RNA	4,54
buněčný cyklus, buněčné dělení	2,03
regulace buněčné smrti, apoptózy	1,60
intracelulární transport, lokalizace proteinů	1,50
metabolismus ribonukleotidů	1,45
odpověď na buněčný stres, opravy DNA	1,27
<b>MDA-MB-468-ΔNp63α</b>	
<b>Genová ontologie – biologický proces</b>	
sestřih RNA	3,03
buněčná polarita, morfogeneze	2,37
organizace cytoskeletu	2,15
vytváření makromolekulárních komplexů, oligomerizace proteinů	1,92
negativní regulace organizace buněčných komponent	1,65
intracelulární transport, lokalizace proteinů	1,12

#### LC-MS/MS metoda

Vzorky byly rozpuštěny ve 20 µl 0,1% kyseliny mravenčí (Sigma Aldrich, USA) a podrobeny LC-MS/MS analýze na kapalinovém chromatografu UltiMate 3000 RSLCnano spojeném on-line s MS Orbitrap Elite. Fosfopeptidy byly nejprve odsoleny na předkolonce C18 PepMap 100 (30 µm × 5 mm; velikost částic: 5 µm) a následně byly separovány na analytické koloně Acclaim PepMap RSLC C18, (75 µm × 150 mm; velikost částic: 2 µm). Jako mobilní fáze byly použity 0,1% kyselina mravenčí (A) a 0,08% kyselina mravenčí v 80% acetonitrilu (B). Pro postupnou

eluci peptidů z kolony byl zvolen gradient s lineárně se zvyšující organickou frakcí (0–4 min 2 % B, 68 min 40 % B, 70–80 min 98 % B, 81–105 min 2 % B). Detekce eluovaných fosfopeptidů, jejichž efektivní hmotnost se nacházela v rozmezí 400–2 000, probíhala pomocí MS při rozlišení 120 000 (pro 400 m/z). Každý vzorek byl měřen třemi rozdílnými metodami – metodou víceetapové aktivace (CID\_MSA), metodou neutrálních ztrát (CID\_NLMS3) a metodou kombinující CID a ETD fragmentační techniku (CID\_ETD). Nejintenzivnější píky v daném čase byly izolovány a fragmentovány v lineární iontové pasti

(10 000 iontů akumulováno po dobu 10 ms s izolačním oknem 2 m/z; CID: relativní energie 35 %; ETD: aktivační doba 100 ms).

#### Zpracování dat

Data získaná z LC-MS/MS analýz byla zpracována v programu Proteome Discoverer verze 1.4 s algoritmem Phos-

phoRS 3.1 a prohledávána proti lidské databázi Uniprot a Swissprot (databáze stažena v červnu 2014) [29]. Byly zvoleny běžně se vyskytující modifikace peptidů a dále fosforylace na serinu, treoninu a tyrozinu. Pro odstranění falešně pozitivních výsledků byly získané peptidy prohledány proti obrácené databázi a pro identifikaci fosfoproteinů byly vybrány pouze peptidy s menší než 1% falešně pozitivní mírou. Jelikož některé proteiny mají vzájemně společné peptidy, jsou tyto proteiny spojovány do proteinových skupin.

Z fosfoproteinů identifikovaných alespoň jednou ze tří metod byly následně vybrány ty, u kterých došlo po působení tetracyklinu ke kvantitativní změně o více než 20 %. Pro odstranění falešně pozitivních výsledků byly z analýzy vyloučeny proteiny, u nichž došlo ke změně exprese i v kontrolní linii MDA-MB-468-pcDNA6/TR. Hladina těchto proteinů tedy nebyla regulována v závislosti na expresi izoform p63, ale nespecificky samotným půso-

**Tab. 3. Analýza signálních drah (KEGG PATHWAYS).**

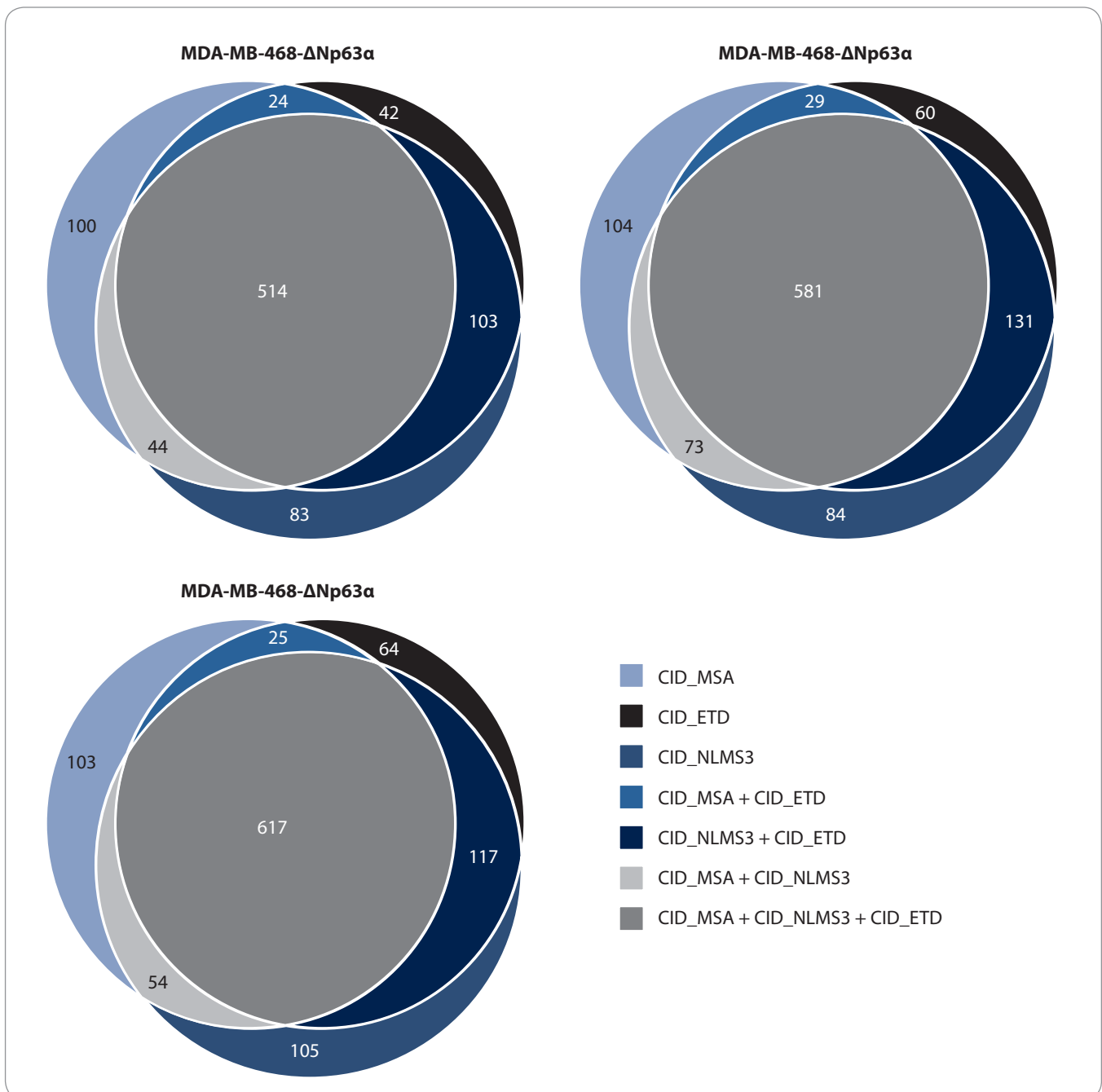
Hodnota p je vypočítána pomocí Fisherova exaktního testu; je-li  $p < 0,05$ , lze říci, že soubor je významně obohacen o geny spojené s touto signální dráhou.

MDA-MB-468-TAp63 $\alpha$	
Analýza signálních drah (KEGG PATHWAY)	hodnota p
spliceozom	0,028
nádory štítné žlázy	0,029
inzulinová signální dráha	0,035
degradace RNA	0,097
MDA-MB-468- $\Delta$ Np63 $\alpha$	
Analýza signálních drah (KEGG PATHWAY)	hodnota p
inzulinová signální dráha	0,002
spliceozom	0,010
replikace DNA	0,025
signální dráha MAPK	0,034

**Tab. 4. Příklady proteinů identifikovaných všemi třemi metodami, tj. s vysokou spolehlivostí.**

Nárůst/pokles jejich hladiny je uveden jako poměr výskytu ve vzorcích značených „těžkými“ (R6K4) a „lehkými“ (R0K0) aminokyselinami.

MDA-MB-468-TAp63 $\alpha$				
UniProt accession	Název	CID_MSA	CID_NLMS3	CID_ETD
P08559	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit $\alpha$	1,517	1,215	1,242
O15231	zinc finger protein 185	1,194	1,289	1,356
Q9ULX3	RNA-binding protein NOB 1	0,450	0,498	0,379
Q9GZR7	ATP-dependent RNA helicase DDX24	0,456	0,583	0,444
Q02880	DNA topoisomerase 2- $\beta$	0,271	0,692	0,654
Q96IZ0	PRKC apoptosis WT1 regulator protein	0,333	0,687	0,624
MDA-MB-468- $\Delta$ Np63 $\alpha$				
UniProt accession	Název	CID_MSA	CID_NLMS3	CID_ETD
P55072	transitional endoplasmic reticulum ATPase	1,832	1,489	1,331
P00533	epidermal growth factor receptor	1,443	1,263	1,260
Q14676	mediator of DNA damage checkpoint protein 1	1,410	1,238	1,150
Q9UN86	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	0,183	0,569	0,650
P27695	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	0,416	0,507	0,497
O00267	transcription elongation factor SPT5	0,554	0,668	0,582
P18887	DNA repair protein XRCC1	0,569	0,648	0,634



**Obr. 4. Vennovy diagramy poukazující na počet společných/rozdílných proteinových skupin získaných analýzou různými fragmentačními technikami.**

Jedná se o fragmentaci pomocí kolizní energie s víceúrovňovou aktivací (CID\_MSA), nebo se skenem neutrálních ztrát (CID\_NLMS3), či o kombinaci fragmentace pomocí kolizní energie a reakce kladně nabitých peptidů s elektrony (CID\_ETD).

bením tetracyklinu. Takto vybrané proteiny, jejichž exprese souvisí s hladinou izoform p63, byly použity pro analýzu genové ontologie a signálních drah pomocí veřejně přístupné databáze DAVID Bioinformatics Resources 6.7 [30,31]. Dále byly vybrány proteiny identifikované s vysokou spolehlivostí, tj. všemi

třemi metodami, u kterých kvantitativní změna vykazovala stejný trend (nárůst vs. snížení).

#### Výsledky

V prvním kroku byla zjišťována vhodnost jednotlivých použitých fragmentačních metod a to na základě počtu identifiková-

vaných proteinových skupin v jednotlivých vzorcích. Získaná data jsou uvedena v tab. 1. Počet identifikovaných proteinových skupin jednotlivými metodami byl srovnatelný. Významně více proteinových skupin bylo identifikováno v případě zpracování dat ze všech třech měření dohromady.

V druhém kroku hodnocení dat byly vybrané fosforylované proteiny použity pro analýzu genové ontologie (tab. 2) a mapování signálních drah (tab. 3). Obě izoformy regulovaly fosfoproteiny podílející se na regulaci sestříhu RNA, izoforma TAp63 $\alpha$  ovlivňovala buněčný cyklus a apoptózu, izoforma  $\Delta$ Np63 $\alpha$  buněčnou polaritu a organizaci cytoskeletu. Konkrétní příklady proteinů (identifikované všemi třemi metodami) s významným kvantitativním rozdílem jsou uvedeny v tab. 4.

## Diskuze

U všech třech analyzovaných vzorků (MDA-MB-468- $\Delta$ Np63 $\alpha$ ; MDA-MB-468-TAp63 $\alpha$ ; MDA-MB-468-pcDNA6/TR) byl identifikován srovnatelný počet proteinů. Každou fragmentační metodou (CID\_MSA, CID\_NLMS3, CID\_ETD) byla kromě společných proteinových skupin získána až desetina unikátních (obr. 4). Ze získaných výsledků je patrné, že kombinování fragmentačních metod je pro identifikaci většího množství fosforylovaných proteinů velmi výhodné. Předpokladem k tomuto přístupu je ovšem použití vysokorozlišovacího MS, který nabízí kombinování více typů fragmentací. Na druhou stranu je třeba upozornit na složitou interpretaci získaných dat. V některých případech může být fosforylace a její lokalizace zachycena pouze jednou metodou, zatímco ostatní metody detekují peptid bez fosforylace. Je tedy třeba vybrat strategii, která danému typu experimentu vyhovuje nejlépe.

Z analýzy fosfoproteinů identifikovaných alespoň jednou ze tří metod vyplynulo, že obě izoformy p63 se podílí na regulaci sestříhu RNA. Tento poznatek je ve shodě s výsledky analýzy interaktomu p63, která ukázala, že p63 interaguje s proteiny, jež jsou součástí tzv. spliceozomu [32,33]. Sestříh RNA je zásadní mechanismus regulace genové exprese, který umožňuje alternativní výběr sestřihových míst, a tím produkuje širokého spektra proteinových izoform [34,35]. Mnoho genů zapojených do regulace buněčného cyklu a apoptózy kóduje proteinové izoformy s odlišnými až antagonistickými funkcemi [36]. Proto je v nádorových buňkách alternativní se-

střih často deregulován ve smyslu produkce izoform s onkogenním účinkem [37]. Nalezení souvislosti exprese izoformem p63 s regulací alternativního sestříhu prostřednictvím změn ve fosforylaci proteinů zapojených do tohoto procesu ukazuje na nový potenciální mechanismus působení tohoto proteinu v nádorových buňkách.

## Závěr

Získání informace o změnách ve fosfoproteomu nádorové buňky je zásadní pro pochopení změn v signálních drahách a může být základem pro vývoj personalizované léčby. Dnes používané techniky jsou schopny zachytit pouze nepatrnou část fosforylovaných proteinů přítomných v daném čase v dané buňce. Metody hmotnostní spektrometrie umožňují v současnosti velmi komplexní pohled na buněčný fosfoproteom, volba konkrétní metody pak závisí na povaze vzorku a požadovaných výsledcích. Jako nejvýhodnější řešení k identifikaci co největšího počtu fosforylovaných proteinů se jeví použití více fragmentačních metod pro měření jednoho vzorku. Tento přístup je spíše než do klinické praxe určen, aspoň prozatím, pouze pro výzkumné účely. Nabízí identifikaci nových proteinů nebo signálních drah aberantně aktivovaných nebo inaktivovaných v nádorových buňkách, které budou v další etapě validovány jako potenciální biomarkery.

## Literatura

1. Yates JR, Shabaz M, Heck AJ. Phosphoproteomics. *Anal Chem* 2014; 86(3): 1313. doi: 10.1021/ac404019p.
2. Reimand J, Wagih O, Bader GD. The mutational landscape of phosphorylation signaling in cancer. *Sci Rep* 2013; 3: 2651. doi: 10.1038/srep02651.
3. Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(1): 28–39. doi: 10.1038/nrc2559.
4. Oda Y, Huang K, Cross FR et al. Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(12): 6591–6596.
5. Gygi SP, Rist B, Gerber SA et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnol* 1999; 17(10): 994–999.
6. Thompson A, Schafer J, Kuhn K et al. Tandem mass tag: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixture by MS/MS. *Anal Chem* 2003; 75(8): 1895–1904.
7. Fila J, Honys D. Enrichment techniques employed in phosphoproteomics. *Amino Acids* 2011; 43(3): 1025–1047. doi: 10.1007/s00726-011-1111-z.
8. Pinkse MW, Uitto PM, Hilhorst MJ et al. Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from

9. proteolytic digests using 2D-nano LC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns. *Anal Chem* 2004; 76(14): 3935–3943.
9. Ficarro SB, McClelland ML, Stukenberg PT et al. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnol* 2002; 20(3): 301–305.
10. Mann M, Ong S, Grønborg M et al. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol* 2002; 20(6): 261–268.
11. Hoffert JD, Knepper MA. Taking aim at shotgun phosphoproteomics. *Anal Biochem* 2008; 375(1): 1–10.
12. Boersema PJ, Mohammed S, Heck AJ. Phosphopeptide fragmentation and analysis by mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2009; 44(6): 861–878. doi: 10.1002/jms.1599.
13. MaxQuant.org [homepage on the Internet]. MaxQuant. Max planck institute of biochemistry. Martinsried, Germany; c2015 [cited 2015 March 30]. Available from: <http://www.maxquant.org/>.
14. Taus T, Köcher T, Pichler P et al. Universal and confident phosphorylation site localization using phospho RS. *J Proteome Res* 2011; 10(12): 5354–5362. doi: 10.1021/pr200611n.
15. Pjehová M, Hernychová L, Tomašec P et al. Analýza fosfoproteinů a signálních drah kvantitativno-proteomickými metodami. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): S116–S120. doi: 10.14735/amko20141S116.
16. Yang A, Schweitzer R, Sun D et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 1999; 398(6729): 714–718.
17. Hibi K, Trink B, Patturajan M et al. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(10): 5462–5467.
18. Nylander K, Vojtesek B, Nenuit R et al. Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. *J Pathol* 2002; 198(4): 417–427.
19. Leong CO, Vidnovic N, DeYoung MP et al. The p63/p73 network mediates chemosensitivity to cisplatin in a biologically defined subset of primary breast cancers. *J Clin Invest* 2007; 117(5): 1370–1380.
20. Daniilov AV, Neupane D, Nagaraja AS et al. Delta-Np63 $\alpha$ -mediated induction of epidermal growth factor receptor promotes pancreatic cancer cell growth and chemoresistance. *PLoS One* 2011; 6(10): e26815. doi: 10.1371/journal.pone.0026815.
21. Ramsey MR, Wilson C, Ory B et al. FGFR2 signaling underlies p63 oncogenic function in squamous cell carcinoma. *J Clin Invest* 2013; 123(8): 3525–3538. doi: 10.1172/JCI68899.
22. Wu N, Rollin J, Masse I et al. p63 regulates human keratinocyte proliferation via MYC-regulated gene network and differentiation commitment through cell adhesion-related gene network. *J Biol Chem* 2012; 287(8): 5627–5638. doi: 10.1074/jbc.M111.328120.
23. Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res* 2004; 2(7): 371–386.
24. Su X, Chakravarti D, Cho MS et al. TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of dicer and miRNAs. *Nature* 2010; 467(7318): 986–990. doi: 10.1038/nature09459.
25. Yang A, Kaghad M, Wang Y et al. p63, a p53 homolog at 3q27–29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998; 2(3): 305–316.
26. Ghioni P, Bolognese F, Duijf PH et al. Complex transcriptional effects of p63 isoforms: identification of novel activation and repression domains. *Mol Cell Biol* 2002; 22(24): 8659–8668.
27. Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 2009; 6(5): 359–362. doi: 10.1038/nmeth.1322.



28. 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; 24(2): 219–231. doi: 10.1002/rcm.4377.
29. UniProt.org [homepage on the Internet]. UniProt, c2002–2015 [cited 2015 March 30]. Available from: <http://www.uniprot.org/>.
30. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc* 2009; 4(1): 44–57. doi: 10.1038/nprot.2008.211.
31. Huang Y, Jeong JS, Okamura J et al. Global tumor protein p53/p63 interactome. *Cell Cycle* 2012; 11(12): 2367–2379. doi: 10.4161/cc.20863.
32. Huang da DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(1): 1–13. doi: 10.1093/nar/gkn923.
33. Amoresano A, Di Costanzo A, Leo G et al. Identification of deltaNp63alpha protein interactions by mass spectrometry. *J Proteome Res* 2010; 9(4): 2042–2048. doi: 10.1021/pr9011156.
34. Moore MJ, Wang Q, Kennedy CJ et al. An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell* 2010; 142(4): 625–636. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.019.
35. David CJ, Manley JL. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev* 2010; 24(21): 2343–2364. doi: 10.1101/gad.1973010.
36. Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 2005; 19(1): 1–13.
37. Liu S, Cheng C. Alternative RNA splicing and cancer. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2013; 4(5): 547–566. doi: 10.1002/wrna.1178.