

Analýza fosfoproteínov a signálnych dráh kvantitatívno-proteomickými metódami

An analysis of Phosphoproteins and Signalling Pathways by Quantitative Proteomics

Pjechová M.¹, Hernychová L.¹, Tomašec P.^{1,2}, Wilkinson G. W.^{1,2}, Vojtěšek B.¹

¹ Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

² Department of Medical Microbiology, Institute of Infection and Immunity, School of Medicine, Cardiff University, United Kingdom

Súhrn

Fosforylácia proteínov má kľúčovú úlohu v regulácii bunkových signálnych dráh. Je zahrnutá vo väčšine bunkových dejov, v ktorých súhra medzi kinázami a fosfatázami prísne kontroluje bunkové deje ako napr. proliferáciu, diferenciáciu a apoptózu. Chybné alebo pozmenené signálne dráhy sa mnohokrát podieľajú na vzniku rôznych chorôb, čo iba zdôrazňuje dôležitosť štúdia fosfoproteómu. Abundancia fosfoproteínov je v proteóme často veľmi nízka a na ich analýzu sú potrebné vysoko citlivé a špecifické prístupy. Metódami kvantitatívnej proteomiky je možné analyzovať zmeny v abundancii jednotlivých proteínov a ich posttranslačných modifikáciách a následne i v signálnych dráhach buniek. V tomto článku sa venujeme kvantitatívno-proteomickým metódam, ktoré je možné použiť pri štúdiu fosfoproteínov a ich zapojení do signálnych dráh.

Kľúčové slová

proteomika – fosfoproteíny – signálne dráhy

Summary

Protein phosphorylation is a key regulator in cellular signaling pathways. It is involved in most cellular events in which interplay between phosphatases and kinases strictly controls biological processes, such as differentiation, proliferation and apoptosis. Altered or defective signaling pathways often result in various diseases, emphasizing the importance of studying the phosphoproteome. The abundance of phosphoproteins in the proteome is often very low, which requires specific and highly sensitive approaches. By using quantitative proteomics methods, we are able to analyze changes in abundance of proteins and their posttranslational modifications and then changes in signaling pathways. In this review, we describe quantitative proteomics methods, which could be used for study of phosphoproteins and their connection in signaling pathways.

Key words

proteomics – phosphoproteins – signaling pathways

Práca bola podporená Európskym fondom pre regionálny rozvoj a štátnym rozpočtom Českej republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work 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) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

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.



Mgr. Mariana Pjechová
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: mariana.pjechova@mou.cz

Obdržené/Submitted: 30. 1. 2014

Přijaté/Accepted: 14. 4. 2014

Úvod

Fosforylácia proteínov je jedným z najrozšírejších regulačných mechanizmov v prírode. Je kľúčovým regulátorom vnútrobunkových biologických procesov a momentálne najštudovanejšou posttranslačnou modifikáciou proteínov. Fosforyláciou je obvykle iniciovaná signálna transdukcija a šírené signály v signálnych dráhach buniek. Je to dočasná a reverzibilná posttranslačná modifikácia, ktorá vedie k zmenám konformácie, aktivity a interakcií proteínov vo veľmi krátkom časovom úseku. Proteínovú fosforyláciu riadia dve skupiny proteínov: kinázy (fosforylujú proteíny) a fosfatázy (defosforylujú proteíny). Často sú fosforylované viaceré rezidua proteínu, a to väčšinou rôznymi kinázami. Spomedzi aminokyselín sa u eukaryotov môže fosforylovať serín, treonín, tyrozín a histidín, ktorý je však veľmi labilný a zriedka identifikovaný vo fosfoproteomických štúdiách.

Prístupy kvantitatívnej proteomiky nám dovoľujú analyzovať zmeny v expresii proteínov (a fosfoproteínov) za rôznych podmienok a taktiež aj určit zmenu fosforylácie jednotlivých proteínov, ktoré tvoria základnú funkčnú jednotku signálnych dráh.

V porovnaní s ostatnými proteínmi sú fosfoproteíny v bunkách prítomné vo veľmi nízkych množstvách, čo komplikuje ich detekciu hmotnostným spektrometrom a následné analýzy. Z tohto dôvodu sú potrebné techniky, ktoré umožňujú obohatenie vzoriek o fosfopeptidy (po proteolytickom štiepení proteínov na peptidy) pred hmotnostne spektrometrickou analýzou. „Strong cation exchange chromatography“ (SCX) [1], „hydrophilic interaction liquid chromatography“ (HILIC) [2], obohatenie fosfopeptidov oxidom titaničitým (TiO₂) [3] či „immobilized metal ion affinity chromatography“ (IMAC) [1] patria medzi techniky pomocou ktorých sme schopní úspešne izolovať fosfopeptidy pred MS analýzou. Následná kvapalinová chromatografia v spojení s tandemovou MS analýzou (LC-MS/MS) je vhodný prístup, ktorý dovoľuje identifikáciu a kvantifikáciu tisícok fosforylačných miest počas jednej analýzy. Tieto, ale aj ďalšie metódy a postupy použí-

vané vo fosfoproteomických experimentoch budeme bližšie rozoberať v nasledujúcej časti článku.

Metódy kvantifikácie fosfoproteínov

Na kvantifikáciu zmien fosfoproteínov je možné použiť proteomické prístupy ako napr. „stable isotope labeling with amino acids in cell culture“ (SILAC) [4], ktorý sa dá použiť iba na živé bunkové kultúry. Jedná sa o metabolické značenie aminokyselín, pri ktorom v priebehu kultivácie dochádza k inkorporácii ťažkých aminokyselín (značené stabilné izotopy lyzínu a arginínu) do novosyntetizovaných proteínov. Pri tejto metóde je možné použiť ťažké izotopy lyzínu a arginínu (R10K8), stredne ťažké izotopy lyzínu a arginínu (R6K4) a neznačené, ľahké médium (R0K0).

Medzi izotopické značenia fosfopeptidov patria napr. ICAT, dimetylové a ¹⁸O značenie.

ICAT (isotope-coded affinity tags), teda thiol-reaktívne molekuly obsahujúce ťažké alebo ľahké izotopy, predstavuje jednu z najstarších techník [5]. ICAT značka pozostáva z reaktívnej skupiny, ktorá je orientovaná na cysteín, polymerového linkera s ôsmimi deuteriami a biotínovej skupiny, ktorá dovoľuje purifikáciu značených peptidov. V ICAT experimente sú dva proteínové pooly denaturované a redukované, cysteínové rezidua proteínov sú následne značené ľahkým alebo ťažkým reagentom. Značené pooly sú potom zmiešané, prečistené od nadbytečného reagentu a štiepené vhodnou proteázou. Peptidy obsahujúce cysteín, nesúce ľahkú alebo ťažkú značku sú následne zachytené pomocou avidínovej kolóny, cez biotínovú skupinu na značke. Peptidy sú potom vyeluované z kolóny a analyzované na MS [6].

Pri dimetylovom značení sú proteíny najprv štiepené vhodnou proteázou, ako napr. trypsin, následne sú peptidy z rôznych vzoriek označené dimetylovými značkami a analyzované na LC/MS, pričom rozdiel abundancie dimetylových značiek je použitý na porovnanie rozdielov v abundancii peptidov vo vzorkách. Toto značenie je založené na reakcii primárnych peptidových amínov (N-konce

peptidov a epsilonové amino skupiny lyzínových rezidui) s formaldehydom a vytvorení Schiff bázy, ktorá je rapidne redukovaná pridaním cyanoborohydridu. Dimetylové značenie je možné použiť ako triplex, kde je pri značení „ľahkou značkou“ použitý obyčajný formaldehyd a cyanoborohydrid, čo spôsobí zvýšenie hmotnosti o 28 Da na primárny amín v peptide. Použitie denaturovaného formaldehydu a obyčajného cyanoborohydridu spôsobí zvýšenie hmotnosti o 32 Da, čo je stredná značka [7]. Inkorporácia ťažkej značky je dosiahnutá kombináciou denaturovaného a ¹³C-značeného formaldehydu s cyanoborodeuteridom, čo vedie k zvýšeniu hmotnosti o 36 Da [8].

Značenie pomocou ¹⁸O je relatívne jednoduchá, enzýmovo-sprostredkovaná technika značenia peptidov pomocou H₂¹⁸O. Tento prístup je spojený s proteázami 2. triedy, napr. trypsinom, ktoré katalyzujú výmenu dvoch ¹⁶O atómov za dva ¹⁸O atómy na C-terminálnej karboxylovej skupine proteolitického peptidu, čo vedie k posunu hmotnosti o 4 Da medzi 1-krát nabitými rôzne značenými peptidmi v MS1 móde [6].

TMT (tandem mass tag) [9] a iTRAQ (the isobaric tag for relative and absolute quantitation) [10] sú izobarické značenia fungujúce na veľmi podobnom princípe. V porovnaní s tradičnými kvantifikačnými metódami sú schopné použitím tandemovej MS analýzy simultánne identifikovať a kvantifikovať 6–8 vzoriek. TMT molekula pozostáva z reaktívnej skupiny, ktorá značí primárne amínové skupiny; reportérovej skupiny, ktorá udáva v MS/MS móde abundanciu peptidu po zmiešaní peptidov; odštiepiteľného linkeru, ktorý uvoľňuje TMT reporterový fragment v MS/MS analýze a hmotnostne normalizačnej skupiny, ktorá vyrovnáva hmotnostné rozdiely medzi jednotlivými reportérovými fragmentami na udržanie konštantnej celkovej hmotnosti značiek v sete [11]. Keďže sa jedná o izobarické značky, kvantifikácia prevedená v MS/MS móde porovnaním plôch píkovo označených iónov vychádza z fragmentácie značky, teda rovnaké spektrum je použité na kvantifikáciu a identifikáciu fosfopeptidu [12].

Pri label free kvantifikácii sú proteínové zmesi analyzované priamo a vzorky sú navzájom porovnané až po samostatných analýzach. Pri tejto metóde nie sú vzorky zmiešané, teda je možné dosiahnuť vyššieho proteómového pokrytia a neexistuje žiaden limit v počte vzoriek, ktoré môžu byť porovnávané [13]. Nevýhodou tohto prístupu je neprítomnosť formálneho vnútorného štandardu, čo môže viesť k významným chybám v individuálnych datasetoch. Tento nedostatok je však minimalizovaný analýzou niekoľkých biologických replikátov [6].

Proteolytické štiepenie

Pred hmotnostnou analýzou je potrebné vzorky upraviť tak, aby boli kompatibilné s meraním na hmotnostnom spektrometri. Prvým krokom je štiepenie proteínov na peptidy použitím vhodnej proteázy. Na to, aby mohla proteáza proteíny efektívne štiepiť, je potrebná ich denaturácia, redukcia a alkylácia. Na denaturáciu sa používajú rôzne reagenty, napr. β -merkaptetoetanol, SDS. Medzi najviac používané redukčné činidlo patrí dithio-treitol (DTT) alebo Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP), ktoré redukujú disulfidové mostíky medzi cysteínovými skupinami. Nasleduje alkylácia thiolových skupín pomocou jódacetamidu (IAA), ktorý zabráňuje ich reoxidácii. Proteíny sú potom štiepené proteázami na peptidy, ktoré je možné analyzovať na hmotnostnom spektrometri. Používajú sa proteázy s vysokou špecificitou štiepenia, aminokyselinové reťazce štiepia iba za určitými aminokyselinami. Jednou z najbežnejšie používaných proteáz je trypsin, ktorý štiepi reťazec aminokyselín na karboxylovej strane lyzínu a arginínu, ak za nimi nenasleduje prolín. Existuje viacero postupov, ako proteíny pripraviť na proteolytické štiepenie. Ich výber závisí na type a množstve vzorky, keďže pri niektorých postupoch sú starty vzoriek väčšie než pri iných.

Pred vlastným proteolytickým štiepením je potrebné odstrániť denaturačný roztok, ktorý nie je kompatibilný s proteolytickými enzýmami, a preto sa zamieňa za roztok močoviny. Pri „filter aided sample preparation“ (FASP) protokole sa tento krok deje na „cut off“ fil-

tri (10 kDa, alebo 30 kDa), kde prebieha aj následná redukcia, alkylácia a vlastné proteolytické štiepenie. Medzi nevýhody tohto postupu patrí čiastočná strata vstupného materiálu na filtri [14].

Štiepenie v roztoku je postup, pri ktorom sa do skúmavky so vzorkou proteínov postupne pridávajú jednotlivé roztoky zaisťujúce denaturáciu, redukciu a alkyláciu (napr. močovina, DTT, IAA). Prebytok alkylačného činidla je následne odstránený pridaním redukčného činidla, aby sa v hmotnostnom spektre neobjavovali satelitné peptidové píky nesúce vzniknuté modifikácie zvyšujúce ich m/z . Nakoniec sa pridáva proteáza a roztok NH_4HCO_3 , ktorý je s ňou kompatibilný a poskytuje vhodné podmienky na štiepenie. V prípade tohto postupu vstupný materiál síce zostáva zachovaný, ale všetky pridané reagenty zostávajú v roztoku spolu so vzorkou a pred ďalším krokom je nutné získané peptidy purifikovať [15].

Pri štiepení proteínov v géli sa bunkový lyzát najprv rozseparuje na polyakrylamidovom géli. Zväčša sa používajú denaturačné 1D alebo 2D elektroforézy, ktoré separujú denaturované proteíny podľa molekulovej hmotnosti (proteíny s najvyššou hmotnosťou putujú v géli najpomalšie), čím zároveň umožňujú presné stanovenie molekulovej hmotnosti. Pri 1D elektroforéze sa proteíny separujú iba podľa molekulovej hmotnosti. Pri 2D elektroforéze sa proteíny rozdeľujú najprv podľa izoelektrického bodu, čo je pH, pri ktorom majú molekuly nulový náboj, a nepohybujú sa v elektrickom poli [16]. Nasleduje ich delenie v druhom smere podľa molekulovej hmotnosti. Najväčšou výhodou týchto postupov je prečistenie proteínov od nízkomolekulových nečistôt, ako napr. detergentov a zložiek pufrův, ktoré často nie sú kompatibilné s následnou MS analýzou. Na vizualizáciu proteínov sa používajú napr. trifenylmetánové farbivá Coomassie brilliant blue (R250, G250), ktoré sa viažu na proteíny prostredníctvom van der Waalesových a elektrostatických interakcií [17]. Najbežnejšie používanou je Coomassie brilliant blue G250, ktorá je schopná vizualizovať už 0,3 ng proteínu v géli. Komerčne sú dostupné aj fluorescenčné

značky, napr. Sypro Ruby, Flamingo, či Deep Purple, ktoré majú senzitivitu okolo 1 ng detekovaného proteínu. Veľmi citlivým prístupom je farbenie striebrom, pomocou ktorého je možné vizualizovať 0,3 ng proteínu. Po farbení sú jednotlivé bandy vyrezané z gélu, odfarbené a proteíny štiepené proteázou. Nevýhoda tejto metódy spočíva v strate proteínov nerozpustných v SDS pufrí a proteínov s nízkou molekulovou hmotnosťou [18].

Separácia peptidov pomocou kvapalinovej chromatografie

Na rozdelenie komplexných vzoriek peptidov získaných FASP protokolom alebo štiepením v roztoku, ako aj na odstránenie zložiek, ktoré môžu interferovať s ďalšími postupmi, je možné použiť kvapalinovú chromatografiu. High-performance liquid chromatography (HPLC) môže byť použitá na separáciu peptidov na základe hydrofobicity, náboja alebo veľkosti. Kombináciou vhodných analytických kolón a gradientov je možné vybrať frakcie obsahujúce peptidy a fosfopeptidy a ďalej ich analyzovať. Vybrané typy kolón a ich vlastnosti budú popísané v ďalšej časti:

- Na negatívne nabitých funkčných skupinách kolóny strong cation exchange chromatography (SCX) sa pri pH 2,7 zachytávajú najmä 1-krát fosforylované +1 kladne nabité fosfopeptidy. V eluovanej frakcii sa nachádzajú multifosforylované peptidy, preto je nutné eluát zachytiť [1].
- Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) je vysoko rozlišovacia separačná technika, pri ktorej sa využívajú vodíkové interakcie medzi peptidom a neutrálnou, hydrofilnou stacionárnou fázou. Retencia vzrastá so zvyšujúcou sa polaritou peptidu. Vzorky sú nanášané vo fáze s vysokým podielom organických zlučenín a eluované zvyšujúcou sa polaritou mobilnej fázy [2].
- Electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography (ERLIC) je separácia založená na anion exchange chromatography v kombinácii s hydrofilnými interakciami. Fosfátové skupiny sú čiastočne ionizované a elektrostaticky priťahované k stacionárnej

fáze. Ako prvé sú eluované nefosforylované, monofosforylované a difosforylované peptidy, keďže multifosforylované peptidy obsahujú viacero negatívnych nábojov na fosfátových skupinách a eluujú sa neskôr [19].

Techniky obohacovania vzoriek o fosfopeptidy

Obohatenie fosfopeptidov je kľúčový krok v príprave vzoriek na identifikovanie fosforylovaných aminokyselín. Koncentrácia fosfoproteínov je v bunke v porovnaní s ostatnými proteínmi veľmi nízka a sú takmer nemerateľné dostupnými technikami hmotnostnej spektrometrie. Fosfopeptidy zle ionizujú, čo je dôsledkom prítomnosti fosfátovej skupiny, ktorá je záporne nabitá. Tým ovplyvňuje efektivitu ionizácie a detekcie pri kyslých podmienkach, ktoré sa používajú pri analýze v pozitívnom móde [20]. Fosfopeptidy bývajú v spektrách prekryté fragmentmi nefosforylovaných/abundantnejších peptidových iónov, ktoré majú oveľa vyššiu intenzitu signálu. Na získanie/obohatenie fosfopeptidov zo vzoriek bolo vyvinutých viacero metód, ktoré využívajú väzbu fosfátovej skupiny na maticu. Medzi najviac používané obohacovacie metódy patria obohatenie fosfopeptidov oxidom titaničitým (TiO_2), immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) a sequential elution from IMAC (SIMAC).

V prípade TiO_2 (voľné častice s priemerom 10 μm) dochádza k väzbe fosfopeptidu cez fosfátové OH skupiny za kyslých podmienok. Uvoľnenie tejto väzby nastáva za zásaditých podmienok, pričom uvoľnené sú najmä monofosforylované peptidy (multifosforylované peptidy sa na TiO_2 viažu s príliš vysokou afinitou a ich elúcia je veľmi obtiažna). Na TiO_2 sa môžu viazať aj kyslé peptidy, čomu sa dá predísť znížením pH kyseliny trifluóroctovou alebo pridaním kyseliny dihydrobenzoovej, či mliečnej, ktoré sa na TiO_2 viažu s vyššou afinitou než kyslé peptidy, ale s nižšou než fosfopeptidy [3].

Pri metóde IMAC sú ióny kovov (Fe^{3+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Co^{2+}) chelátované na častice pokryté nitrilotriocetovou alebo iminodiacetovou kyselinou, čím vytvárajú sta-

cionárnu fázu, na ktorú sa môžu naviazať negatívne nabité fosfopeptidy v mobilnej fáze. Táto metóda je vhodná hlavne pre obohatenie multifosforylovaných peptidov. Vážnym problémom tohto postupu je nešpecifická väzba nefosforylovaných peptidov obsahujúcich viacnásobne kyslé reziduá aminokyselín, čo znižuje selektivitu. Jednou z možností ako zvýšiť selektivitu tejto metódy je rovnako ako pri TiO_2 zníženie pH [1].

SIMAC metóda kombinuje výhody TiO_2 a IMAC prístupu. Keďže pri IMAC sú preferenčne naviazané multifosforylované peptidy a pri TiO_2 monofosforylované, kombináciou týchto dvoch metód je možné dosiahnuť jednoduchého obohatenia mono- i multifosforylovaných peptidov. IMAC je použitý ako prvý krok, kde po väzbe nasleduje elúcia monofosforylovaných peptidov za kyslých podmienok (pH 1,0) a potom elúcia multifosforylovaných peptidov za základných podmienok (pH 11,3). Ďalším krokom je obohatenie monofosforylovaných peptidov TiO_2 časticami [1].

Hmotnostne spektrometrická analýza

Peptidy (fosfopeptidy) je možné identifikovať pomocou MALDI-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization – mass spectrometry, tj. hmotnostného spektrometru s ionizáciou pomocou laseru za účasti matrice) alebo prostredníctvom LC-MS/MS (liquid chromatography – mass spectrometry) s elektrosprejovou ionizáciou. Pri hlbších fosforylačných štúdiách je dôležité určiť špecifickú aminokyselinu, ktorá bola fosforylovaná (miesto fosforylácie) v danom biologickom experimente. Preto sa využíva tandemová MS analýza s collision-induced dissociation (CID) a electron-transfer dissociation (ETD) fragmentáciou. Pri CID fragmentácii dochádza k strate fosfátovej skupiny H_3PO_4 pri fosfoseríne a fosfotreoníne a HPO_3 pri fosfotyrozíne. Nedostatkami tejto metódy sú nízka ionizačná efektivita a skorá strata labilnej fosfátovej skupiny, čo má za následok nízky počet peptidových fragmentov na identifikáciu. ETD štípe peptidovú kosť bez odštiepenia labilných posttranslačných mo-

difikácií, ako napr. fosforylácie. ETD má vyššiu pravdepodobnosť úspešnej fosfopeptidovej identifikácie pre prekuzory s nízkym m/z a nábojovým stavom > 2 , kým CID je úspešnejšia pre dvojnásobne nabité peptidy a tie s vysokým m/z [21]. Niektoré štúdie porovnávajú ETD a CID navrhujú využitie oboch metód fragmentácie na dosiahnutie komplexnej analýzy fosforylácie [21–23].

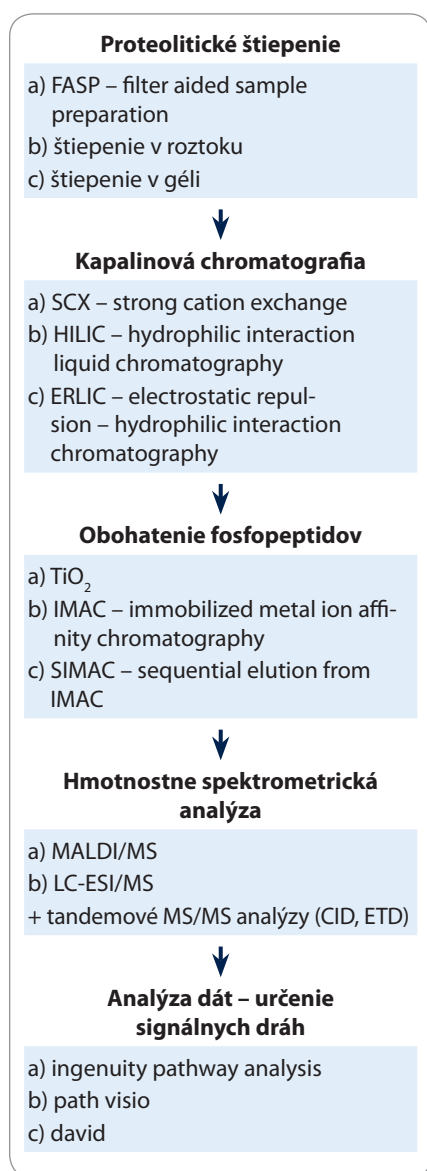
Analyzovanie dát

Kritickou súčasťou všetkých proteomických štúdií je analýza dát, pri ktorej sa využívajú bioinformatické a štatistické prístupy. Získané MS/MS dáta sú porovnané s databázou Uniprot proteome [24] s použitím softwarov Mascot (Matrix Science Inc.) alebo Sequest [25]. Na spracovanie dát, prehľadanie databáz a kvantitatívne vyhodnotenie rozdielov medzi fosfoproteínmi v jednotlivých vzorkách je možné použiť program Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific) s algoritmom PhosphoRS 3.1 [26] umožňujúcim predikciu lokalizácie fosforylovaných miest. K dispozícii sú aj ďalšie podobné programy MaxQuant [27] a SkyLine [28].

Pri identifikovaných fosfoproteínoch je potrebné brať do úvahy zmenu fosforylácie oproti kontrolnej vzorke a celkovej expresii proteínu. Proteíny so signifikantnými zmenami fosforylácie môžu byť ďalej použité na štúdium signálnych dráh pomocou špecializovaných programov ako napr. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) [29], David [30] alebo PathVisio [31]. Tieto programy sú schopné graficky znázorniť signálne dráhy na základe informácií získaných z databáz a vedeckých publikácií. Umožňujú tiež porovnanie jednotlivých dráh, a teda definovanie hlavných rozdielov medzi signálnymi dráhami v rôznych bunkách.

Záver

Na štúdium zmien v signálnych dráhach buniek je možné využiť proteomické prístupy. Kvantitatívna proteomika umožňuje určiť zmeny v signálnych dráhach zahŕňajúce zmeny v expresii proteínov, ako aj zmeny v posttranslačných modifikáciách (fosforyláciách), ktoré



Tab. 1. Schéma postupu spracovania vzorky proteomickými metódami.

sú základným mechanizmom pri zapínaní/vypínaní signálnych dráh. Vzhľadom na nízku abundanciu fosfoproteínov v bunkách a ich problematické zachytenie hmotnostným spektrometrom je správna voľba metód kľúčovým krokom (tab. 1.).

Nedostatky pri momentálne používaných postupoch poskytujú široký priestor na vylepšenie metód. Zamedzenie straty materiálu pri príprave vzoriek, či väzbe kyslých peptidov na častice pri

obohacovacích technikách sú problémy, ktoré je nutné riešiť. Nemenej dôležitými sú i obmedzenia v MS analýze a bioinformatických aplikáciách. Rovnako aj zdokonaľovanie starých a vývoj nových metód a programov na analýzu môže rapídne prispieť k vylepšeniu detekcie a identifikácie proteínov.

Literatúra

1. Thingholm TE, Jensen ON, Larsen MR. Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics* 2009; 9(6): 1451–1468. doi: 10.1002/pmic.200800454.
2. Alpert AJ. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr* 1990; 499: 177–196.
3. Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON et al. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4(7): 873–886.
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: 994–999.
6. Sap KA, Demmers JA (eds). *Labeling Methods in Mass Spectrometry Based Quantitative Proteomics* [monograph on the Internet]. *Integrative Proteomics*; 2012 [cited 2014 January 3]. Available from: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/29631.pdf>.
7. Hsu JL, Rist B, Chow NH et al. Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Anal Chem* 2003; 75(24): 6843–6852.
8. Boersema PJ, Aye TT, van Veen TA et al. Triplex protein quantification based on stable isotope labeling by peptide dimethylation applied to cell and tissue lysates. *Proteomics* 2008; 8(22): 4624–4632. doi: 10.1002/pmic.200800297.
9. Thompson A, Schäfer J, Kuhn K et al. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem* 2003; 75(8): 1895–1904.
10. Ross PL, Huang YN, Marchese JN et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3(12): 1154–1169.
11. Licker V, Patel V, Ward M (eds). *Characterisation of human cerebrospinal fluid (CSF) after tandem mass tag (TMT0) labelling* [monograph on the Internet]. Université de Genève; 2008 [cited 2014 January 3]. Available from: http://www.mpb.unige.ch/reports/rap_VirginieLicker.pdf.
12. Nita-Lazar A, Saito-Benz H, White FM. Quantitative phosphoproteomics by mass spectrometry: past, present, and future. *Proteomics* 2008; 8(21): 4433–4443. doi: 10.1002/pmic.200800231.
13. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 2007; 389(4): 1017–1031.
14. Wiśniewski 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.
15. Btk.fi [homepage on the Internet]. Turku: Centre for Biotechnology, Finland [cited 2014 January 5]. Available

from: http://www.btk.fi/fileadmin/Page_files/proteomics/PDF-files/Protocols/In_solution_trypsin_digestion.pdf.

16. Vgn.uvm.edu [homepage on the Internet]. Vermont Genetics Network. University of Vermont [cited 2014 January]. Available from: http://vgn.uvm.edu/outreach/documents/Garfin_1EF_WebArticle9-07.pdf.
17. Nationaldiagnostics.com [homepage on the Internet]. Atlanta: National Diagnostics; Georgia; c2011 [cited 2014 January 5]. Available from: <https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/staining-protein-gels-coomassie-blue>.
8. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 2006; 1(6): 2856–2860.
19. Alpert AJ. Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides. *Anal Chem* 2008; 80(1): 62–76.
20. Steen H, Jeganathirajah JA, Rush J et al. Phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5(1): 172–181.
21. Swaney DL, McAlister GC, Coon JJ. Decision tree-driven tandem mass spectrometry for shotgun proteomics. *Nat Methods* 2008; 5(11): 959–964. doi: 10.1038/nmeth.1260.
22. Molina H, Horn DM, Tang N et al. Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(7): 2199–2204.
23. Sweet SM, Bailey CM, Cunningham DL et al. Large scale localization of protein phosphorylation by use of electron capture dissociation mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8(5): 904–912. doi: 10.1074/mcp.M800451-MCP200.
24. Uniprot.org [homepage on the Internet] Uniprot, c2002–2014 [cited 2014 January 5]. Available from: <http://www.uniprot.org/>.
25. Eng JK, McCormack AL, Yates JR. Sequest algorithm publication: an approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom* 1994; 5(11): 976–989. doi: 10.1016/1044-0305(94)80016-2.
26. Taus T, Köcher T, Pichler P et al. Universal and confident phosphorylation site localization using phosphoRS. *J Proteome Res* 2011; 10(12): 5354–5362. doi: 10.1021/pr200611n.
27. MaxQuant.org [homepage on the Internet]. MaxQuant. Max planck institute of biochemistry. Martinsried; Germany; c2013 [cited 2014 January 7]. Available from: <http://www.maxquant.org/>.
28. Skyline.gs.washington.edu [homepage on the Internet]. MacCoss Lab Software. Washington: University of Washington, Seattle; c2014 [cited 2014 January 7]. Available from: <https://skyline.gs.washington.edu/labkey/wiki/home/software/Skyline/page.view?name=de-faude>.
29. Ingenuity.com [homepage on the Internet]. Ingenuity. CA: Redwood City [cited 2014 January 7]. Available from: <http://www.ingenuity.com/>.
30. David.abcc.ncifcrf.gov [homepage on the Internet]. DAVID Bioinformatics Resources 6.7. National Institute of allergy and infectious diseases, Frederick, MD [cited 2014 January 7]. Available from: <http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>.
31. van Iersel MP, Kelder T, Pico AR et al. Presenting and exploring biological pathways with PathVisio. *BMC Bioinformatics* 2008; 9: 399. doi: 10.1186/1471-2105-9-399.